



THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE

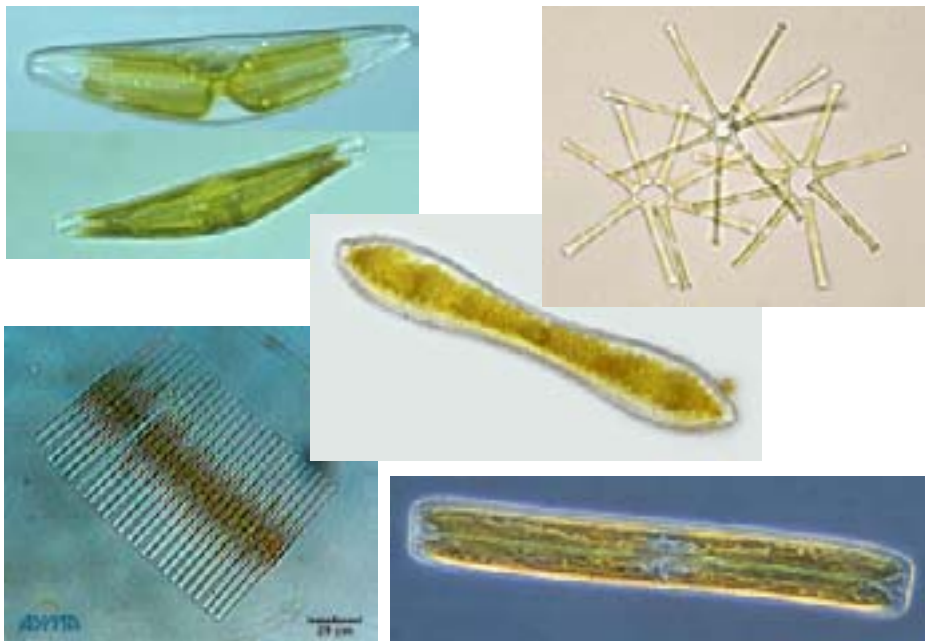
"Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement"

par Caroline GOLD

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR

SPECIALITE : Ecotoxicologie

**Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn)
sur la structure des communautés de diatomées
périphytiques des cours d'eau**
Approches expérimentales in situ et en laboratoire



N° d'ordre : 2487

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE

"Sciences du vivant, Géosciences et Sciences de l'Environnement"

par **Caroline GOLD**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : Ecotoxicologie

**Etude des effets de la pollution métallique (Cd/Zn)
sur la structure des communautés de diatomées
périphytiques des cours d'eau.
Approches expérimentales *in situ* et en laboratoire**

Soutenue le : 26 mars 2002

Après avis de :

Mme A. CAZAUBON, Professeur, Directeur du E2CM, UMR 6116, Université d'Aix-Marseille Rapporteur
Mr. S. SABATER, Professeur, Institut d'Ecologia Aquatica, Université de Barcelona, Espagne Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mr. A. BOUDOU, Professeur, Directeur du LEESA, UMR CNRS 5805, Université Bordeaux 1 Président
Mme A. CAZAUBON, Professeur, Directeur du E2CM, UMR 6116, Université d'Aix-Marseille Rapporteur
Mr. S. SABATER, Professeur, Institut d'Ecologia Aquatica, Université de Barcelona, Espagne Rapporteur
Mme J. GARRIC, DR, UR Biologie des Ecosystèmes Aquatiques, Cemagref de Lyon Examineur
Rapporteur de soutenance
Mr. J. PRYGIEL, DR, Chef de Mission Ecologie du Milieu, Agence de l'Eau Artois-Picardie Examineur
Mme A. FEURTET-MAZEL, Maître de Conférences, LEESA, UMR CNRS 5805, Université
Bordeaux 1 Examineur
Mr. M. COSTE, DR, UR Qualité des Eaux, Cemagref de Bordeaux/ Cestas Examineur



Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre le **Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques** (LEESA) de l'Université Bordeaux 1 (UMR CNRS EPOC¹ 5805), et l'Unité de Recherche Qualité des Eaux du Département Gestion des Milieux Aquatiques du **Cemagref de Bordeaux/Cestas** (Gironde).

Les recherches ont été financées par une **bourse de thèse Cemagref / Région Aquitaine**, ainsi que par les fonds européens Feder², le Ministère de l'Environnement, l'Agence de l'Eau Adour-Garonne et, en tant que soutien de base, l'Université Bordeaux 1 et le CNRS.

¹ UMR EPOC : Unité Mixte de Recherche Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Côtiers.

² Feder : Fond Européen d'aide au Développement et à l'Équipement Régional.

J'aimerais remercier le Professeur **Arlette Cazaubon**, directrice du Laboratoire d'Ecologie des Eaux Continentales Méditerranéennes de l'Université d'Aix-Marseille (UMR CNRS 6116), et le Professeur **Sergi Sabater**, de l'Institut d'Ecologia Aquatica de l'Université de Barcelone, qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également **Jeanne Garric**, directrice de l'Unité de Recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques du Cemagref de Lyon, qui a accepté de faire partie du jury et d'être rapporteur de soutenance, et **Jean Prygiel**, Chef de Mission Ecologie du Milieu de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, qui a également fait partie du jury.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Professeur **Alain Boudou**, directeur du Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques de l'Université Bordeaux 1 (UMR CNRS EPOC 5805), qui m'a accueillie dans son laboratoire. La confiance qu'il m'a témoignée tout au long de mon DEA et de ma thèse, ainsi que l'attention constante qu'il a portée à mes travaux et à mes requêtes, m'ont réellement encouragée et permis de progresser. Grâce à son soutien, j'ai également pu m'initier à l'enseignement, en étant Monitrice puis Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'Université Bordeaux 1.

Je remercie également **François Delmas**, directeur de l'Unité de Recherche Qualité des Eaux du Cemagref de Bordeaux/Cestas, qui m'a fait confiance à l'issue de mon DEA et qui m'a permis d'obtenir une bourse de thèse cofinancée par le Cemagref de Bordeaux/Cestas et par la Région Aquitaine.

J'ai eu la grande chance d'être encadrée, au cours de mon DEA et de ma thèse, par deux personnalités formidables, tant du point de vue de leur rigueur scientifique que de leurs qualités humaines.

Agnès Feurtet-Mazel, Maître de Conférences au Laboratoire d'Ecophysiologie et d'Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques de l'Université Bordeaux 1 (UMR CNRS EPOC 5805), fut celle qui m'a dirigée « au quotidien ». Elle m'a guidée au cours de ces quatre années avec

beaucoup d'attention, de patience et de partage, portant toujours un grand intérêt à mes recherches autant qu'à mes états d'âme. Le soutien et les conseils d'Agnès ont été un véritable moteur pour moi, m'amenant à évoluer au niveau scientifique et personnel. Au cours de cette dernière année de thèse, notre collaboration s'est prolongée dans le cadre d'enseignements. J'ai pu constater que son « professionnalisme » ne se limitait pas uniquement à l'encadrement de ma thèse. Elle fait également l'unanimité parmi les étudiants, tout comme dans sa vie personnelle. Je tiens à lui exprimer ici toute ma gratitude, et mon affection.

Michel Coste, Directeur de Recherche au sein de l'Unité de Recherche Qualité des Eaux du Cemagref de Bordeaux/Cestas, a co-dirigé ma thèse. Même si nos relations furent plus distantes géographiquement, il a toujours été très attentif à mes travaux et à mes requêtes. Ses grandes compétences en systématique et en écologie des communautés algales ont été un soutien fondamental dans nos recherches. Sa profonde gentillesse et sa grande humilité, reconnues de tous, ont rendu notre collaboration très agréable. Je tiens à le remercier chaleureusement pour son aide précieuse et ses nombreux encouragements. Avoir été la première thésarde "officielle" de Michel a été un grand plaisir et un honneur.

Pour mener à bien nos recherches, nous avons bénéficié des compétences et du soutien de nombreux autres chercheurs et techniciens. Je pense particulièrement à **Henry Bouillard** et **Bruno Etcheverria**, grâce auxquels nous avons pu concevoir les nouveaux supports méthodologiques nécessaires à nos travaux. Je pense également à **Véronique Roques-Duflo**, qui était toujours partante pour une virée sur le terrain. Je garde un très bon souvenir de nos discussions, sur les trajets Arcachon / Boisse-Penchat, de sa bonne humeur et de son dynamisme.

Une mention d'honneur pour **Régine Maury-Brachet**, qui m'a initiée aux dosages des métaux et a toujours répondu présente en cas de petits dérapages d'appareillages, mais qui a surtout été un de mes piliers affectifs au laboratoire. Elle fut ma première confidente au labo, quand Agnès couvrait sa petite Lena. Leur duo a ensuite fonctionné à merveilles pour me renvoyer énergie positive et encouragements. Je la remercie profondément du soutien constant qu'elle m'a apporté, de sa joie de vivre communicative, de sa spontanéité, de sa malice.

Je n'oublie pas les autres membres du LEESA, qui ont participé à créer une atmosphère très amicale au sein du laboratoire, que j'aurai bien du mal à quitter. Je pense particulièrement à **Alexia**, **Cathy**, **Jean-Pierre**, **Magalie**, **Nathalie** et **Pierre**. Je ne saurais oublier **Véro** et **Laurette**, qui se sont lancées dans l'aventure de la thèse quelques années après

moi. Leur soutien a beaucoup compté, tout comme nos barbecues à La Salie et nos soirées au Bobo. Leur amitié constitue un des grands acquis positifs de ma thèse. Je pense également à notre équipe de "lofters" 2002, avec *Audrey, Etienne, Ludo* et *Tiphaine*, qui ont largement contribué à rendre cette dernière année de thèse très amicale.

J'ai une pensée particulière pour ma mère et pour mon frère, qui m'auront soutenue et encouragée tout au long de mon parcours universitaire. Pour Juliette, avec qui j'ai eu la chance de partager bons et moins bons moments. Et enfin pour Simon, que j'aime profondément.

SOMMAIRE

PREAMBULE	1
------------------------	---

INTRODUCTION	2
---------------------------	---

<u>PARTIE I</u> – LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES ET LA POLLUTION METALLIQUE : ETAT DES CONNAISSANCES

8

A- LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES : un compartiment biologique-clé pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau	10
---	----

B- LES EFFETS DES POLLUTIONS METALLIQUES SUR LES DIATOMEES PERIPHYTIQUES : de nombreux travaux menés jusqu'à présent aux différents niveaux d'intégration biologique mais encore peu de résultats utilisables pour la bioindication	17
--	----

<u>PARTIE II</u> – LES BASES METHODOLOGIQUES COMMUNES A NOS DIFFERENTES APPROCHES EXPERIMENTALES

25

A- LE "SITE-ATELIER" SUR LA RIVIERE LOT : à la source d'une des plus importantes pollutions métalliques (Cd/Zn) du grand Sud-Ouest français	28
--	----

B- ANALYSE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES : caractérisation quantitative et qualitative de leur structure	35
--	----

C- ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU : évaluation des facteurs influençant la structure des communautés périphytiques	39
---	----

D- TRAITEMENT DES DONNEES ISSUES DE L'ANALYSE DES COMMUNAUTES ET DU MILIEU	41
---	----

PARTIE III – ETUDES *IN SITU* EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES
DES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE SUR LA STRUCTURE DES
COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES

43

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	46
B- COMPARAISON DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES "RESIDENTES" DEVELOPPEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION : évaluation en conditions semi-contrôlées des effets de la pollution métallique sur des communautés exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement¹	50
C- ANALYSE DE COMMUNAUTES NATURELLES LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION ET COMPARAISON AVEC LES COMMUNAUTES "RESIDENTES" DEVELOPPEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX : évaluation de la représentativité de nos systèmes expérimentaux par rapport au milieu naturel	64
D- EVOLUTION STRUCTURALE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX "TRANSFERES" ENTRE DIFFERENTS POINTS DU GRADIENT DE POLLUTION : évaluation en conditions semi-contrôlées des effets de la pollution métallique sur des communautés exposées aux métaux à un stade plus avancé de développement	69
E- CONCLUSION	76

PARTIE IV – ETUDES *IN SITU* EN CONDITIONS NON CONTROLEES
DES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE
SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES

81

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	83
B- TRANSFERT DE COMMUNAUTES DE DIATOMEES LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION ET COMPARAISON AVEC LES COMMUNAUTES "RESIDENTES" : évaluation en conditions non contrôlées des effets de la pollution métallique sur des communautés en stade avancé ou en phase initiale de développement²	85
C- COMPARAISON DES RESULTATS DE TERRAIN OBTENUS EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES ET EN CONDITIONS NON CONTROLEES	102

¹ Article soumis à *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* en décembre 2001.

² Article accepté par *Water Research* en janvier 2002.

**PARTIE V – ETUDES EN LABORATOIRE DE LA CONTAMINATION PAR LE CADMIUM
DE COMMUNAUTES DE DIATOMÉES PERIPHYTIQUES COLLECTÉES *IN SITU***

107

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	109
B- EXPOSITION AU CADMIUM DE COMMUNAUTES EN PHASE INITIALE DE DEVELOPPEMENT ET DE COMMUNAUTES MATURES : évaluation en conditions contrôlées des effets de la pollution métallique sur la structure de communautés présentant différents stades de développement ¹	112
C- COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS <i>IN SITU</i> ET EN LABORATOIRE	132

**PARTIE VI – ETUDE MONOSPECIFIQUE EN LABORATOIRE DES EFFETS DU CADMIUM
SUR LA CROISSANCE D'*Achnanthydium minutissimum***

138

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	140
B- RESULTATS ET DISCUSSION	144
C- CONCLUSION	147

PARTIE VII – BILAN ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

148

A- LES ETUDES EN LABORATOIRE CONSTITUENT DE BONS OUTILS METHODOLOGIQUES POUR AIDER A L'INTERPRETATION DES RESULTATS COMPLEXES OBTENUS <i>IN SITU</i> ..	151
B- LES COMMUNAUTES DE DIATOMÉES PERIPHYTIQUES PEUVENT REPRESENTER DES INDICATEURS BIOLOGIQUES PERTINENTS DE LA POLLUTION METALLIQUE	154
C- LE DEVELOPPEMENT D'APPROCHES MONOSPECIFIQUES S'AVERE NECESSAIRE POUR EVALUER LES NIVEAUX DE TOLERANCE AUX METAUX DES DIATOMÉES ET ETUDIER LEURS MECANISMES D'ADAPTATION	159

¹ Article accepté par *Freshwater Biology* en janvier 2002.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

162

ANNEXES

ANNEXE I : Liste des Diatomées citées dans le mémoire

ANNEXE II : Communications orales ou affichées à des congrès scientifiques

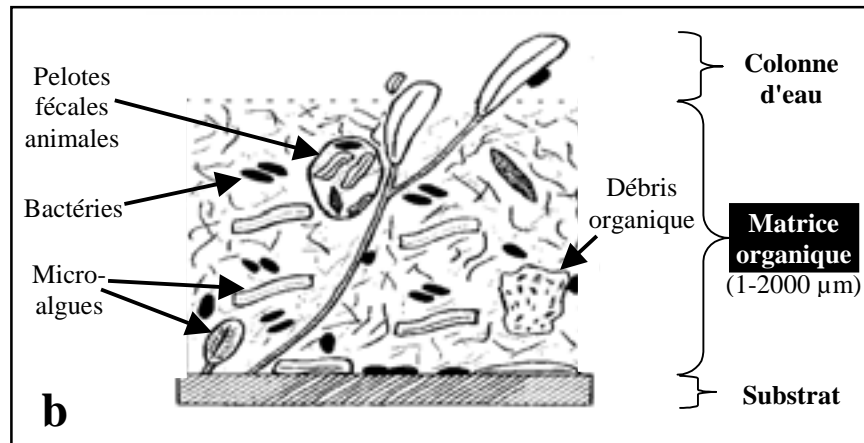
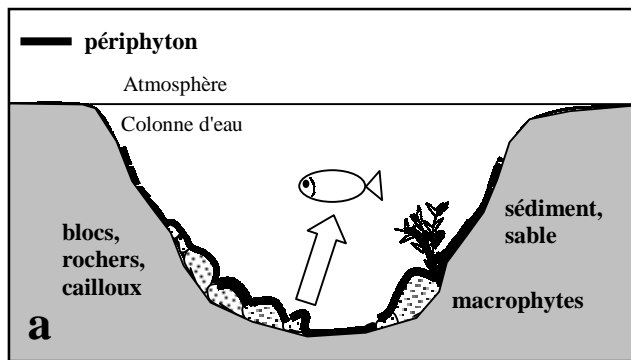


Figure 1 : (a) Coupe schématique d'un cours d'eau figurant les différents substrats à la surface desquels se développe le périphyton. (b) Structure générale des biofilms périphytiques.

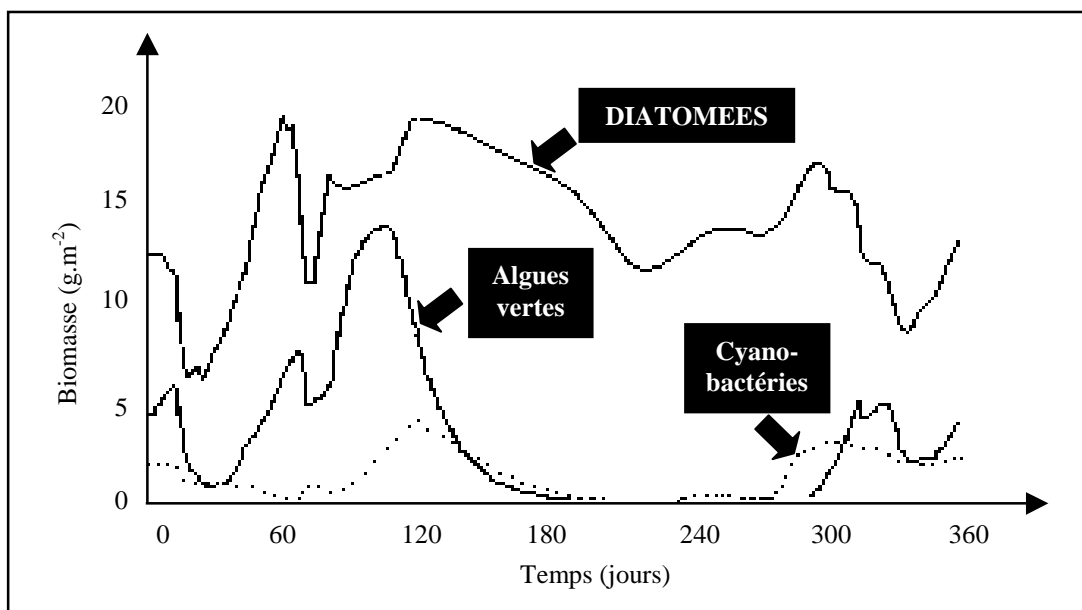


Figure 2 : Exemple illustrant le développement saisonnier des différents groupes d'algues périphytiques au sein d'un cours d'eau (l'échelle de temps démarre au 1^{er} janvier et s'arrête au 31 décembre) (d'après McIntire *et al.* 1996, modifié).

PREAMBULE

Le rôle écologique primordial des communautés de diatomées périphytiques et leur intérêt pour la bioindication de la qualité des cours d'eau

Le périphyton est une composante essentielle des cours d'eau. Il désigne les micro-organismes (micro-algues, bactéries, champignons, etc.) qui se développent à la surface des substrats immergés, imbriqués dans une matrice constituée de substances polymériques excrétées par les bactéries et les algues et de particules inorganiques et détritiques (Lock *et al.* 1984, Roemer *et al.* 1984, Hoagland *et al.* 1993) (**Figure 1**). Les micro-algues périphytiques sont responsables d'une grande part de la production primaire au sein de nombreux écosystèmes lotiques, où le courant limite le développement des algues phytoplanctoniques et des macrophytes (Whitton 1980). Parmi ces micro-algues, les diatomées sont abondantes et peuvent constituer la quasi-totalité du peuplement végétal à certaines périodes de l'année (Whitton 1980, McIntire *et al.* 1996) (**Figure 2**).

Les communautés de diatomées périphytiques regroupent une grande variété d'espèces présentant des niveaux de tolérance différents vis-à-vis des facteurs environnementaux. De nombreuses études, menées pour déterminer l'influence de facteurs tels que la température, la lumière, les nutriments ou la vitesse du courant sur la structure de ces communautés, ont mis en évidence une grande variabilité de leur composition spécifique en fonction des caractéristiques du milieu (Patrick 1971, Stevenson 1983, Luttenton and Rada 1986, Robinson and Rushforth 1987, Steiman and McIntire 1986, Bothwell *et al.* 1989, Stevenson *et al.* 1991, Humphrey and Stevenson 1992, De Nicola 1996, Hill 1996, Ghosh and Gaur 1998, Fayolle *et al.* 1999). Les communautés de diatomées étant également sensibles à de nombreuses pollutions aquatiques, l'analyse de leur structure constitue un outil de choix pour l'évaluation biologique de la qualité des cours d'eau (Mc Cormick and Cairns 1994, Lowe and Pan 1996).

INTRODUCTION

Face à l'accroissement très important des pollutions d'origine anthropique dans les milieux aquatiques, l'**utilisation d'indicateurs biologiques**¹ est de plus en plus préconisée pour évaluer la qualité générale des habitats. Alors que les analyses physico-chimiques traditionnelles ne fournissent que des informations ponctuelles sur l'état du milieu, une intégration globale de la qualité de l'eau dans la durée peut être obtenue par l'analyse des organismes aquatiques, qui prennent en compte l'ensemble des variations biotiques et abiotiques de l'environnement sur de longues périodes de temps (Lowe and Pan 1996).

L'utilisation des algues, et en particulier des **communautés de diatomées périphytiques**, pour apprécier la qualité des cours d'eau est ancienne, mais elle a connu un regain d'intérêt au cours de ces dernières années, notamment en raison des difficultés d'application des techniques traditionnelles basées sur les invertébrés benthiques (échantillonnage impossible dans les grands fleuves et les secteurs canalisés). L'analyse des communautés de diatomées périphytiques est actuellement largement utilisée en Europe et en Amérique du Nord pour évaluer le niveau de pollution organique et d'eutrophisation des cours d'eau (Prygiel and Coste 1995). Elle constitue également un des outils-clés du programme de surveillance des rivières établi par la Directive Cadre du Parlement Européen relative à la protection des eaux de surface, des eaux côtières et des eaux souterraines (Directive 2000/60/CE, JOCE du 22/12/2000), dont l'objectif est d'améliorer à moyen terme l'état de ces écosystèmes.

¹ Un **indicateur biologique** est "un organisme ou un ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème, et de mettre en évidence, aussi précocement que possible, leurs modifications, naturelles ou provoquées" (Blandin 1986).

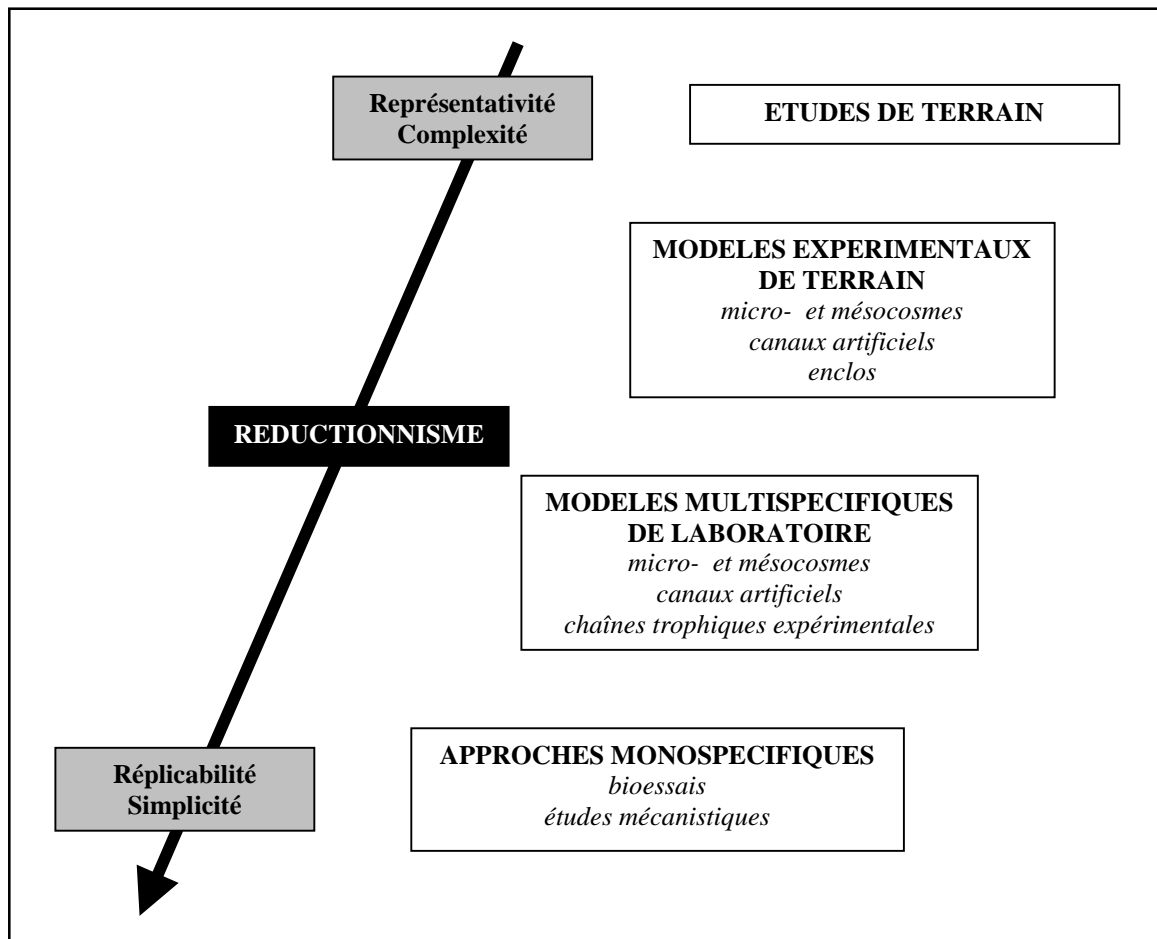


Figure 3 : Les différentes approches méthodologiques en Ecotoxicologie aquatique.

Cependant, les méthodes développées jusqu'à présent pour évaluer la qualité des milieux aquatiques à partir des communautés de diatomées périphytiques sont uniquement basées sur des **corrélations établies en milieu naturel**, entre les communautés observées dans de nombreux habitats et les niveaux de pollution de ces habitats. Or, de simples corrélations ne permettent pas de conclure sur une relation de cause à effet, la structure des communautés de diatomées périphytiques en milieu naturel étant déterminée par l'ensemble des facteurs environnementaux, et pas seulement par le niveau de pollution du milieu. L'amélioration des méthodes existantes et le développement de nouvelles méthodes concernant d'autres types de contaminants nécessitent la réalisation conjointe d'**études expérimentales** en milieu naturel et en laboratoire, permettant de confirmer ou d'infirmer les hypothèses issues des observations globales de terrain, et d'établir les *preferenda* écologiques des espèces de diatomées vis-à-vis des différents facteurs étudiés (Cox 1993).

Face à ce constat, nous avons cherché à développer une démarche méthodologique originale pour évaluer les effets d'un type de pollution particulier - la pollution métallique - sur la structure des communautés de diatomées périphytiques, en réalisant des études présentant des niveaux de "réductionnisme"¹ croissants par rapport à la complexité du milieu naturel (**Figure 3**) : **études multispécifiques** au niveau des communautés de diatomées, dans les conditions complexes du milieu naturel puis dans les conditions simplifiées du laboratoire, et **études monospécifiques** au niveau de populations cultivées en milieu contrôlé. La confrontation des résultats de ces différentes approches devrait nous permettre d'appréhender les effets du ou des facteurs étudiés, et d'évaluer leur importance relative dans les conditions complexes du milieu naturel. Elle devrait ainsi fournir des éléments de réponse à deux questions essentielles:

- *Les communautés de diatomées périphytiques peuvent-elles représenter des **indicateurs biologiques** pertinents de la pollution métallique ?*

- *Les études en laboratoire, menées dans des conditions simplifiées, constituent-elles de bons **outils méthodologiques** pour aider à l'interprétation des résultats très complexes obtenus in situ ?*

¹ "réductionnisme" est pris au sens de simplification des conditions au regard de la physico-chimie des milieux, des facteurs biotiques et des modalités de la contamination. Cette simplification résulte de la réduction du nombre des paramètres par rapport au contexte naturel, et/ou du contrôle et de la régulation de certains d'entre eux.

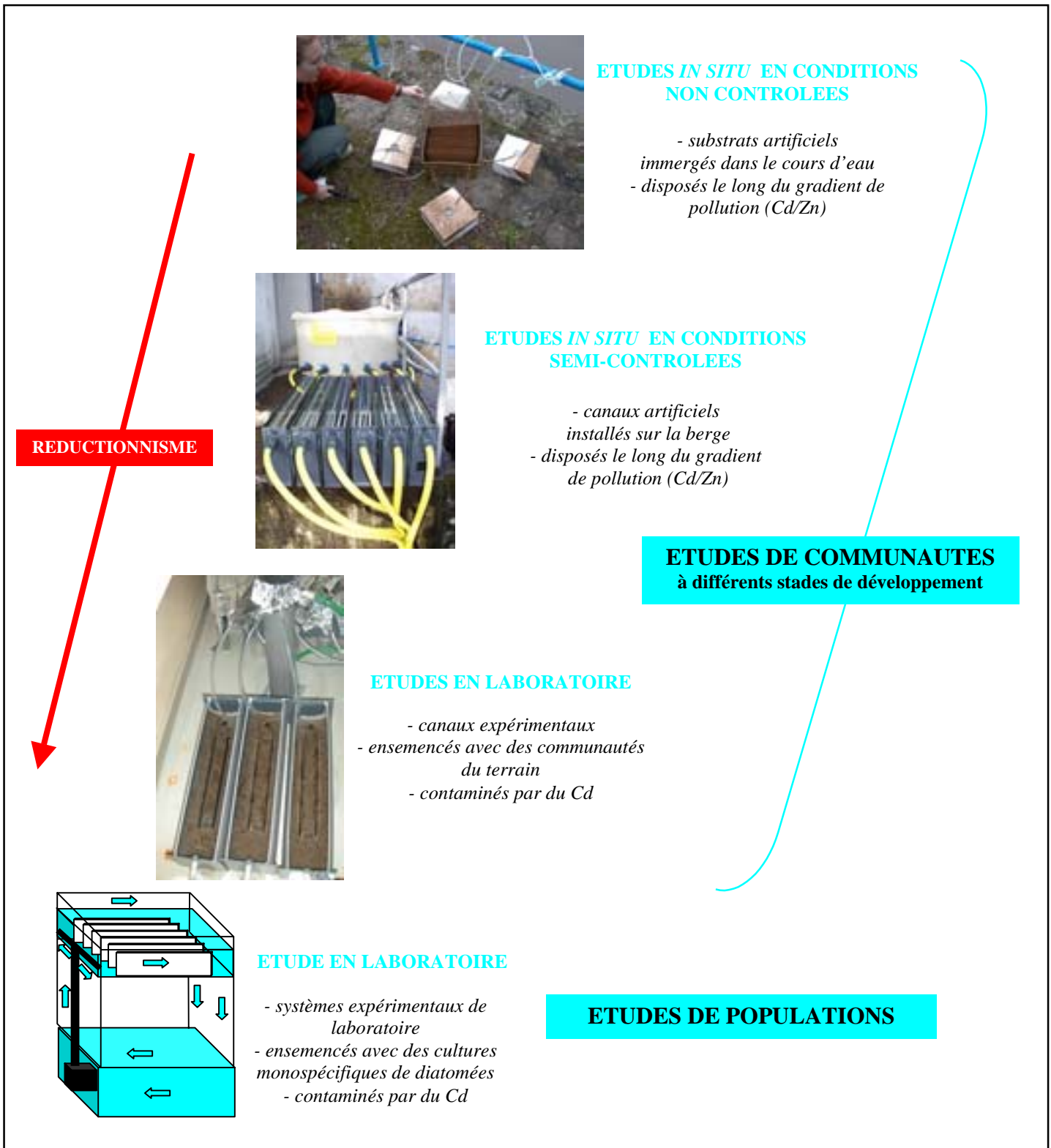


Figure 4 : Schéma des différentes approches expérimentales présentées dans ce mémoire, classées selon leur niveau de "réductionnisme" par rapport à la complexité du milieu naturel.

Pour nos **études à l'échelle des communautés**, nous avons mené trois séries d'approches expérimentales sur le terrain ou en laboratoire, présentant différents niveaux de contrôle des facteurs environnementaux. Ces approches seront présentées successivement dans ce mémoire, suivant l'ordre chronologique¹ de leur réalisation.

Au cours de la première série d'études, une méthodologie originale a permis de comparer la structure des communautés de diatomées périphytiques se développant le long d'un gradient de contamination en cadmium (Cd) et en zinc (Zn) en milieu naturel, en limitant entre les stations d'étude les variations des facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la structure de ces communautés et de masquer les effets des métaux. Des canaux expérimentaux, contenant des substrats artificiels, ont été placés sur les berges des cours d'eau au niveau des différentes stations, et ont permis d'étudier le développement des communautés de diatomées périphytiques dans des conditions semi-contrôlées (vitesse du courant, nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats et conditions lumineuses homogénéisées entre les stations) (**Figure 4**). Les communautés collectées dans les canaux expérimentaux ont été comparées aux communautés naturelles de chaque station, prélevées sur des substrats du lit des cours d'eau, afin d'évaluer la représentativité de notre protocole.

Une deuxième série d'études a été menée en conditions non contrôlées, sur les mêmes stations de terrain, afin de pouvoir estimer l'importance relative des effets supposés des métaux par rapport aux effets des autres variables environnementales. Des substrats artificiels ont été immergés directement dans les cours d'eau au niveau des différentes stations, afin d'étudier le développement des communautés de diatomées périphytiques dans les conditions naturelles de chaque site (**Figure 4**).

Enfin, une troisième série d'études au niveau des communautés a été réalisée en laboratoire, afin de confirmer ou d'infirmer les hypothèses issues des études de terrain. Les études en laboratoire représentent en effet le moyen de contrôler de nombreux facteurs physico-chimiques et de contamination, et d'isoler ainsi les réponses au facteur étudié. Des communautés de diatomées périphytiques collectées dans la rivière Lot ont été introduites en suspension dans la colonne d'eau de canaux expérimentaux de laboratoire (**Figure 4**). Ces canaux ont permis de suivre le développement des communautés sur des substrats artificiels vierges sous différents niveaux de contamination par le Cd, dans des conditions contrôlées (nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats, vitesse du courant, conditions lumineuses, température, ressources en nutriments, niveaux de contamination), fixées de manière à recréer des conditions proches de celles observées lors des études de terrain.

¹ Celui-ci ne correspond pas à l'ordre logique de notre démarche méthodologique visant à accroître la maîtrise

Plusieurs auteurs ayant évoqué l'hypothèse selon laquelle la sensibilité des communautés de diatomées face à un "stress" environnemental varierait en fonction de leur maturité et de leur architecture, particulièrement dans le cas des pollutions métalliques (Lock *et al.* 1984, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a), il nous a paru intéressant d'évaluer les effets des métaux à différents stades du développement de ces communautés. Ainsi, au cours des trois séries d'études évoquées précédemment, nous avons suivi en parallèle l'évolution structurale de communautés exposées à la pollution métallique dès la phase initiale de leur développement, et celle de communautés exposées aux métaux à un stade plus avancé de développement.

Suite aux travaux menés à l'échelle des communautés de diatomées, notre démarche méthodologique a été poursuivie en initiant des **études au niveau des populations**. Les études monospécifiques représentent le moyen d'évaluer le niveau de tolérance "réel" aux métaux d'espèces étudiées séparément, une fois soustraites à l'influence des relations interspécifiques existant au sein des communautés, et dans les conditions contrôlées du laboratoire. Nous avons ainsi étudié les effets du Cd sur la croissance d'une espèce retrouvée dans toutes nos expériences (*Achnanthydium minutissimum*), en introduisant des individus provenant d'une culture algale monospécifique dans des systèmes expérimentaux de laboratoire contenant des substrats artificiels et recréant une circulation d'eau, simulant le courant du milieu naturel (**Figure 4**).

Ces différentes approches expérimentales, visant à étudier les réponses des communautés de diatomées périphytiques, ont été appliquées à l'évaluation des effets de la **pollution métallique**. Les pollutions métalliques font partie des plus importantes pollutions environnementales touchant les cours d'eau, issues principalement de sources ponctuelles d'origine anthropique comme les mines et les fonderies (Nriagu and Pacyna 1988, Nriagu 1996). De nombreuses observations de terrain, rapportées depuis plus de cinquante ans dans plusieurs pays, ont mis en évidence des variations marquées de la composition spécifique des communautés de diatomées périphytiques le long de gradients de pollution métallique (Reese 1937, Besch *et al.* 1972, Say 1978, Say and Whitton 1980, Rushforth *et al.* 1981, Lampkin and Sommerfeld 1982, Roch *et al.* 1985, Deniseger *et al.* 1986, Crossey and La Point 1988, Takamura *et al.* 1990, Lindström and Rorslett 1991, Ivorra *et al.* 1999, Genter and Lehman 2000, Hill *et al.* 2000 a, Sabater 2000). Cependant, aucune méthode basée sur les communautés de diatomées n'a été développée jusqu'à présent pour évaluer le niveau de pollution métallique des cours d'eau, et très peu d'études

des facteurs abiotiques, mais il simplifie la compréhension des protocoles mis en oeuvre.

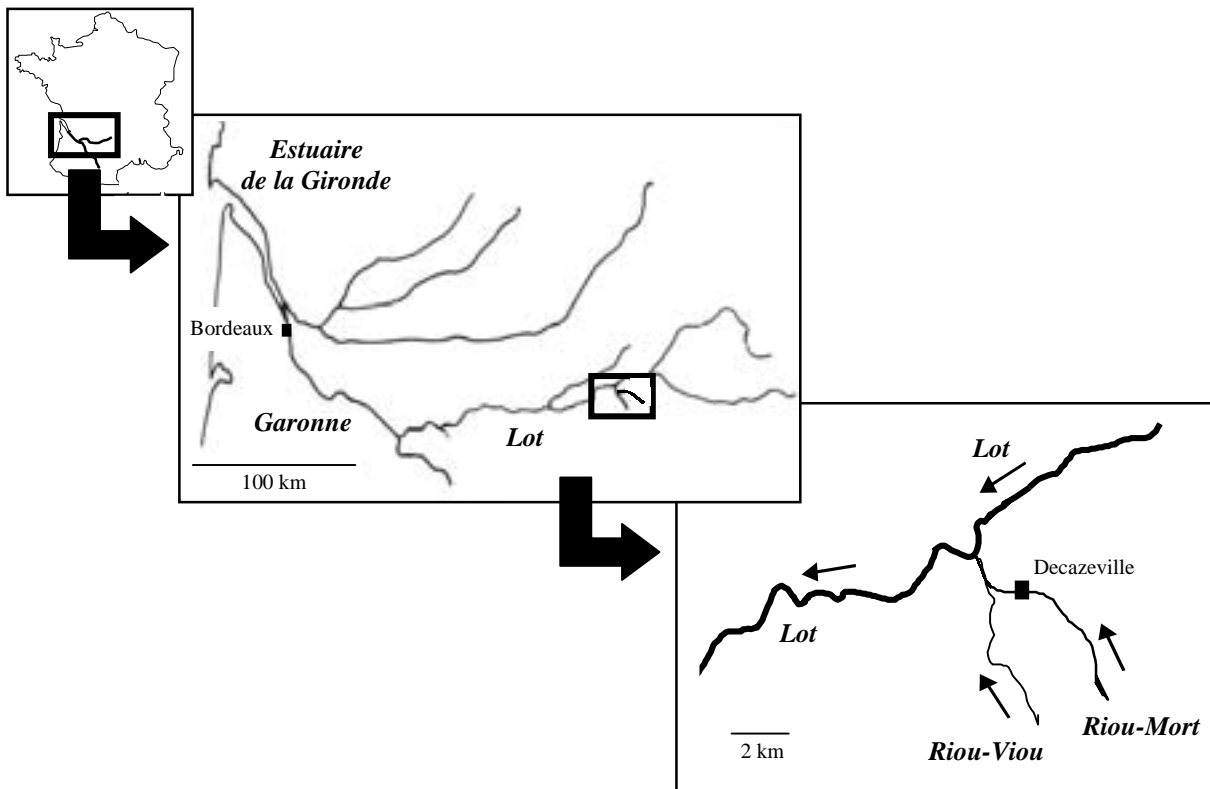


Figure 5 : Localisation du "site-atelier" retenu pour les études de terrain, sur la rivière Lot et sur un de ses affluents, le Riou-Mort.

expérimentales ont été entreprises en laboratoire pour valider les observations de terrain (Genter and Amyot 1994, Péres *et al.* 1995, 1996, 1997, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a).

Nos études de terrain ont été menées dans le département de l'Aveyron (SO, France), sur la rivière Lot et un de ses affluents (le Riou-Mort) (**Figure 5**). Au niveau de cette zone, des rejets industriels de cadmium (Cd) et de zinc (Zn) dans un petit affluent du Riou-Mort (le Riou-Viou) ont provoqué une pollution polymétallique du Lot depuis la fin du XIX^{ème} siècle, qui se propage dans la Garonne jusqu'à l'embouchure de l'estuaire de la Gironde située à plus de 450 km en aval. Ce site, à la source d'une des plus importantes pollutions métalliques du grand Sud-Ouest français, constitue une zone privilégiée pour l'étude des conséquences écotoxicologiques de la pollution métallique. Des travaux ont été menés depuis une dizaine d'années au niveau de ce "site-atelier", sur différents modèles biologiques (poissons, bivalves filtreurs, écrevisses, etc), à l'initiative du Groupement d'Intérêt Scientifique "Environnement, Ecologie et Economie des Bassins de l'Adour et de la Garonne" (GIS-ECOBAG). Cependant, aucune étude des communautés de diatomées périphytiques n'a été réalisée le long de ce gradient de pollution depuis 1978 (Say 1978).

La construction de ce mémoire suit la progression de notre démarche méthodologique, à travers sept parties complémentaires entrecoupées de bilans intermédiaires, synthétisant l'avancée progressive des travaux :

- la partie I est consacrée à un exposé des principales caractéristiques écologiques des communautés de diatomées périphytiques et à une synthèse bibliographique des connaissances acquises jusqu'à présent sur leurs réponses face aux pollutions métalliques ;

- les bases méthodologiques communes à l'ensemble de nos expériences sont abordées dans la partie II, avec la présentation du "site-atelier" et des stations de terrain, ainsi qu'un descriptif des méthodes d'analyse des communautés de diatomées et des facteurs physico-chimiques du milieu ;

- les différentes études que nous avons menées font ensuite l'objet de parties distinctes, et sont présentées pour certaines sous forme d'articles en anglais, soumis ou acceptés : les études *in situ* en conditions semi-contrôlées sont abordées dans la partie III ; les études *in situ* en conditions non contrôlées dans la partie IV ; les études en laboratoire de la contamination par le cadmium de communautés collectées sur le terrain et de cultures algales monospécifiques sont présentées respectivement dans les parties V et VI ;

- un bilan général des résultats obtenus au cours de ces différentes approches est dressé dans la partie VII, suivi de la présentation des principales perspectives de recherches découlant de nos travaux.

PARTIE I

LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES

ET LA POLLUTION METALLIQUE :

ETAT DES CONNAISSANCES

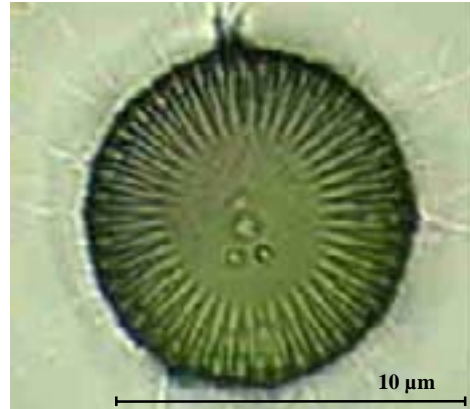
SOMMAIRE DE LA PARTIE I

A- LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES : un compartiment biologique-clé pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau	10
A-1. PRESENTATION GENERALE DES DIATOMEES	10
A-1.1. <i>Structure cellulaire</i>	10
A-1.2. <i>Cycle de développement</i>	11
A-1.3. <i>Classification</i>	11
A-1.4. <i>Répartition et modes de vie</i>	12
A-2. STRUCTURE DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES : variabilité selon les habitats et intérêts pour la bioindication des cours d'eau	13
A-2.1. <i>Un développement progressif en trois dimensions</i>	13
A-2.2. <i>Une grande sensibilité aux facteurs environnementaux</i>	14
A-2.3. <i>De nombreuses potentialités pour l'évaluation biologique de la qualité de l'eau</i>	15
B- LES EFFETS DES POLLUTIONS METALLIQUES SUR LES DIATOMEES PERIPHYTIQUES : de nombreux travaux menés jusqu'à présent aux différents niveaux d'intégration biologique mais encore peu de résultats utilisables pour la bioindication	17
B-1. ETUDES CELLULAIRES	18
B-1.1. <i>Mécanismes de toxicité</i>	18
B-1.2. <i>Mécanismes de tolérance</i>	19
B-2. ETUDES DE POPULATIONS	20
B-3. ETUDES DE COMMUNAUTES	21
B-3.1. <i>De nombreuses études comparant la structure des communautés de diatomées le long de gradients de pollution métallique</i>	22
B-3.1.1. <i>Etudes en conditions non contrôlées</i>	22
B-3.1.2. <i>Etudes en conditions semi-contrôlées</i>	23
B-3.2. <i>Peu d'études en laboratoire pour valider les hypothèses issues des résultats de terrain</i>	23

FORMES SOLITAIRES



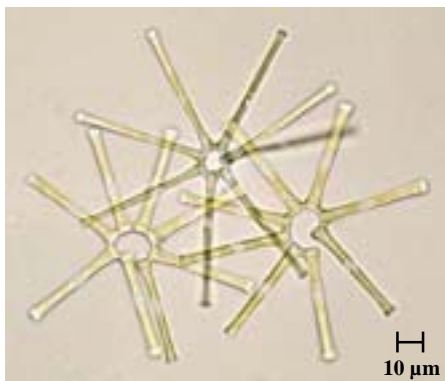
Cymbella sp.



Cyclotella meneghiniana

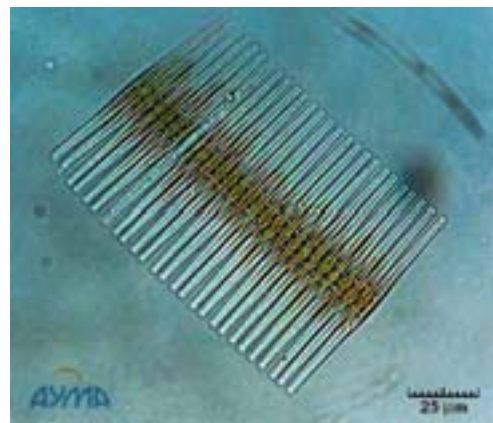
FORMES COLONIALES

colonie étoilée



Asterionella formosa

colonie rubanée



Fragilaria crotonensis

colonie filamenteuse



Melosira varians

Figure 6 : Variations morphologiques des diatomées (formes solitaires ou coloniales)
d'après des observations au microscope photonique d'algues vivantes
(source : <http://www.microscopy-uk.org.uk> et <http://www.mac2031.fujimi.hosei.ac.jp>)

A- LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES :
un compartiment biologique-clé
pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau

A-1. PRESENTATION GENERALE DES DIATOMEES

Les Diatomées, ou Bacillariophycées, sont des micro-algues unicellulaires appartenant à l'embranchement des Chromophytes (algues brunes). Leur taille varie de moins de 10 µm à plus de 500 µm pour les plus grandes. Elles sont principalement solitaires, mais peuvent aussi former des colonies rubanées, étoilées ou filamenteuses (**Figure 6**). Les premières diatomées fossiles datent du Crétacé (120 millions d'années) (Van den Hoek *et al.* 1995) et plus de 100 000 espèces ont été recensées jusqu'à présent (Round *et al.* 1990), se développant dans tous les types de milieux aquatiques, au niveau du phytoplancton et du périphyton.

A-1.1. Structure cellulaire

Les diatomées sont caractérisées par la présence d'une paroi très différenciée autour de la cellule, principalement constituée de silice (le **frustule**). Cette paroi externe est formée de deux valves emboîtées (l'épivalve et l'hypovalve, de plus petite dimension), reliées entre elles par des ceintures connectives (l'épicingulum et l'hypocingulum) (**Figure 7**). Les diatomées produisent des **substances extracellulaires polymériques** (Extracellular Polymeric Substances, EPS), qui peuvent s'organiser en tubes, pédoncules, fibrilles ou former une enveloppe adhésive autour du frustule (Hoagland *et al.* 1993). Ces substances mucilagineuses sont excrétées par la cellule au niveau des perforations réparties sur toute la surface du frustule (Round *et al.* 1990) (**Figure 7**). Elles sont considérées comme étant en grande partie responsables du succès biologique des diatomées, jouant un rôle dans leur mobilité, leur adhésion au substrat, dans la formation des colonies et contre la dessiccation (Hoagland *et al.* 1993).

Le protoplasme sous-jacent ne présente pas de caractéristique particulière. Il contient les mêmes organites que les autres algues eucaryotes : noyau, mitochondries, dictyosomes, chloroplastes, vacuoles, etc. (**Figure 8**). Les chloroplastes présentent une couleur jaune pâle à

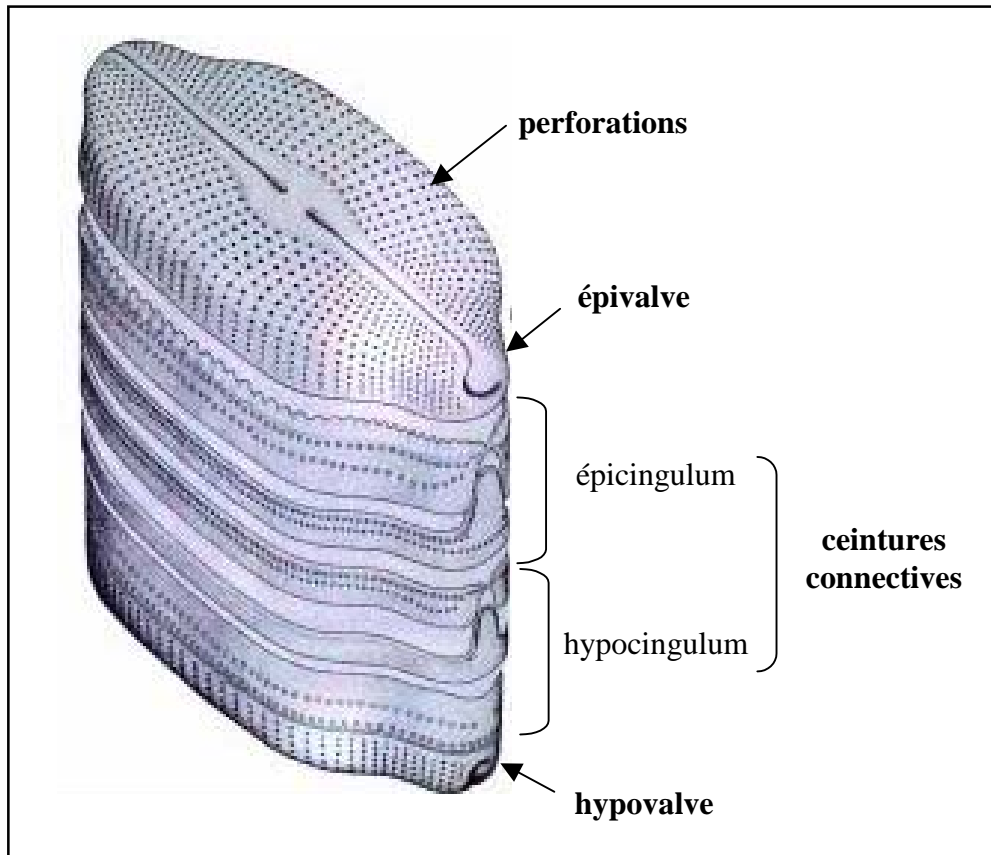
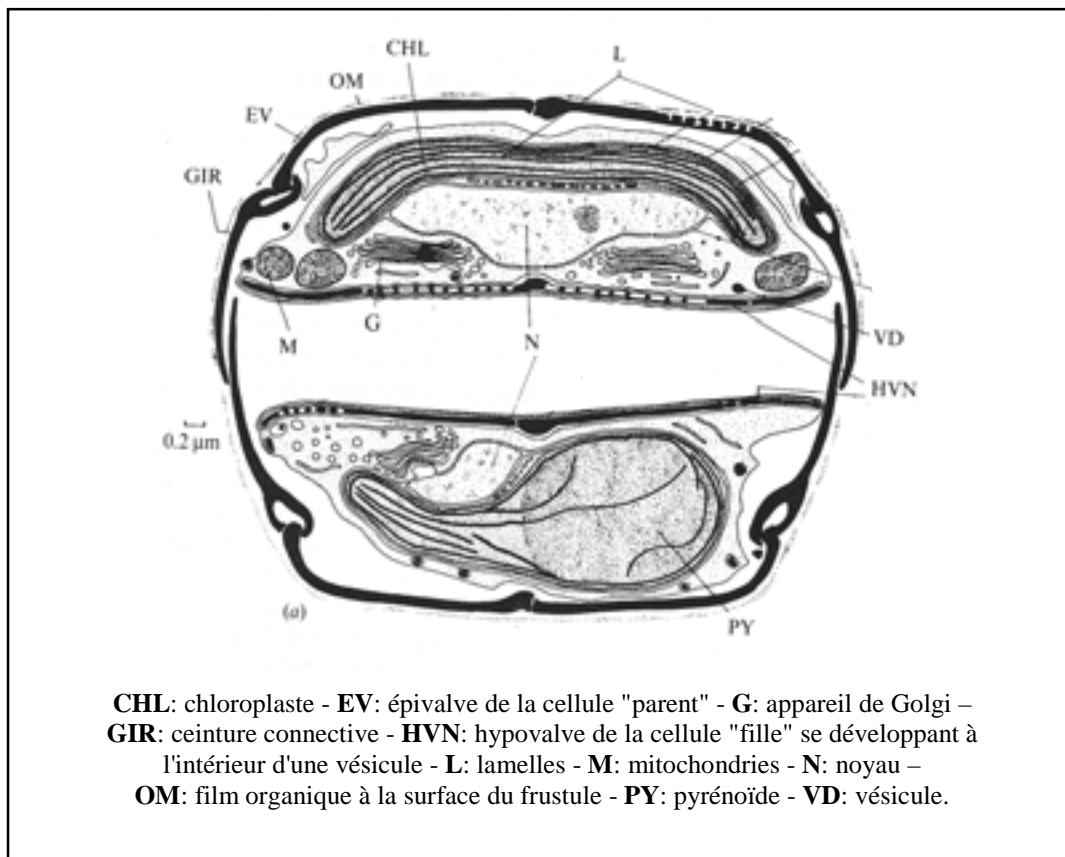


Figure 7 : Structure du frustule d'une diatomée (*Navicula* sp.)
(d'après Round *et al.* 1990, modifié).



CHL: chloroplaste - **EV:** épivalve de la cellule "parent" - **G:** appareil de Golgi –
GIR: ceinture connective - **HVN:** hypovalve de la cellule "fille" se développant à
l'intérieur d'une vésicule - **L:** lamelles - **M:** mitochondries - **N:** noyau –
OM: film organique à la surface du frustule - **PY:** pyrénoïde - **VD:** vésicule.

Figure 8 : Section transversale de la diatomée *Amphipleura pellucida*
après l'étape de division cellulaire, d'après des observations au microscope électronique
(d'après Van Den Hoek *et al.* 1995, modifié).

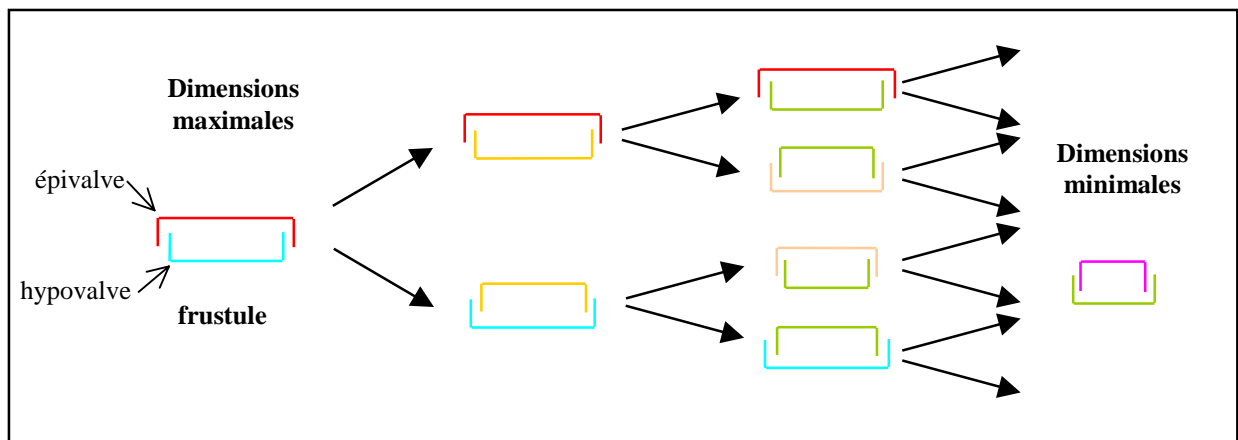


Figure 9 : Schéma illustrant la réduction progressive de la taille des cellules au fil des multiplications végétatives des diatomées (d'après Prygiel and Coste 2000, modifié).

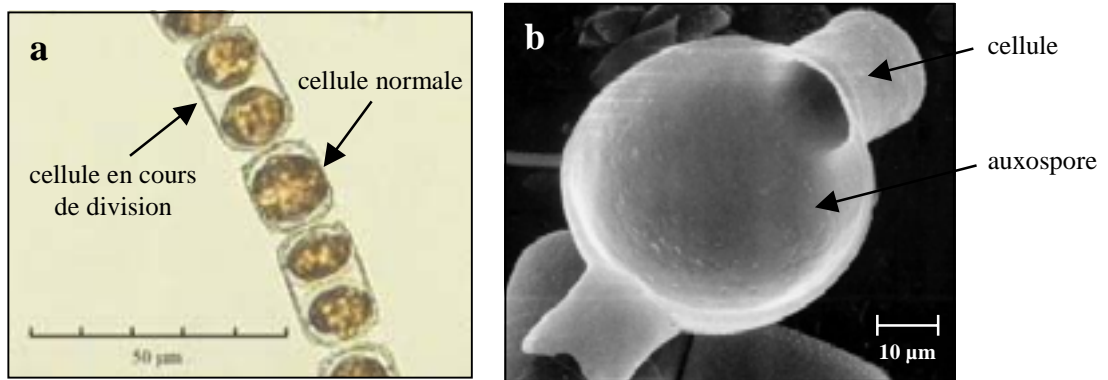


Figure 10 : Microphotographies illustrant les deux modes de reproduction chez la diatomée *Melosira varians* :

- (a) division cellulaire au cours des multiplications végétatives, d'après des observations au microscope photonique ;
- (b) formation d'un auxospore au cours de la reproduction sexuée, d'après des observations au microscope électronique à balayage (<http://www.susqu.edu/biology/algae/melosirastructure.htm>).

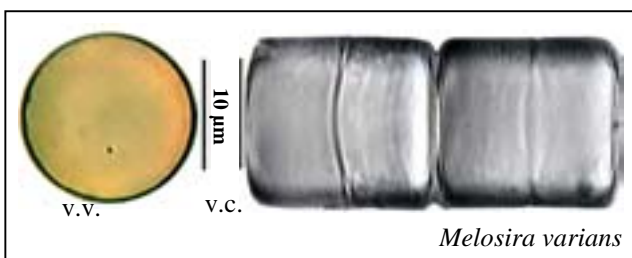
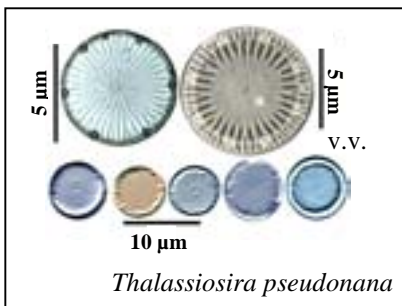
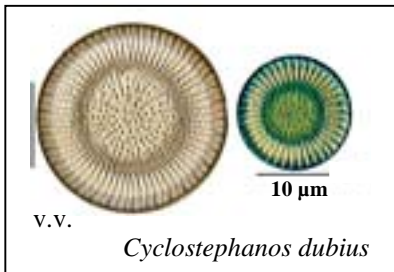
Ordre : CENTRALES

Sous-Ordre : Coscinodiscineae

- Famille : Thalassiosiraceae
- Famille : Melosiraceae
- Famille : Coscinodiscaceae
- Famille : Hemidiscaceae

Sous-Ordre : Rhizosoleniineae

- Famille : Rhizosoleniaceae
- Famille : Biddulphiaceae
- Famille : Chaetoceraceae



Ordre : PENNALES

Sous-Ordre : Araphidineae^(a)

- Famille : Fragilariaceae

Sous-Ordre : Rhaphidineae^(b)

- Famille : Eunotiaceae
- Famille : Achnanthaceae
- Famille : Naviculaceae
- Famille : Epithemiaceae
- Famille : Bacillariaceae
- Famille : Surirellaceae

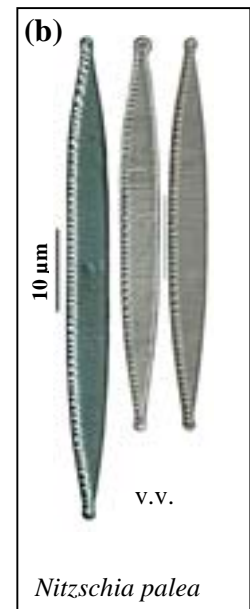
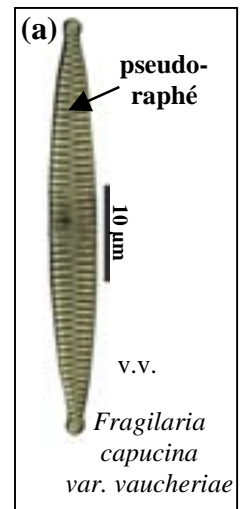
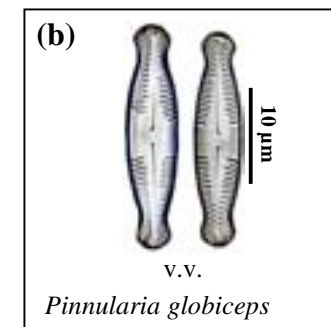
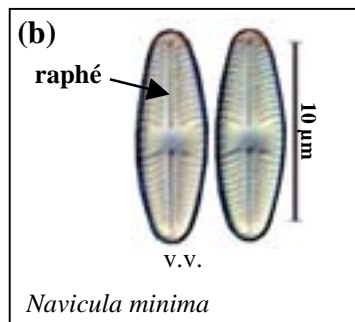
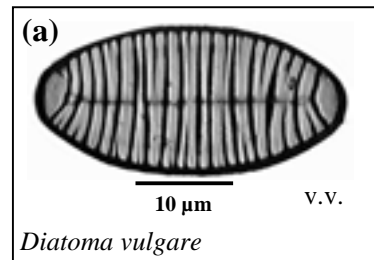


Figure 11 : Classification des diatomées proposée par Krammer & Lange-Bertalot (1986), illustrée par des photographies en microscopie photonique de frustules de diatomées débarrassés de leur contenu organique (v.c. : vue connective, v.v. : vue valvaire) (source : Michel Coste).

brune, qui a déterminé le classement des diatomées dans le groupe des "algues brunes" et qui est due aux pigments caroténoïdes (β -carotène, diatoxanthine, diadinoxanthine et fucoxanthine), masquant la couleur des chlorophylles (chlorophylles a et c).

A-1.2. Cycle de développement

Les diatomées ont un cycle de développement relativement court, allant de quelques heures à quelques jours selon les espèces et les caractéristiques du milieu (Baars 1983). Elles possèdent deux modes de reproduction distincts : multiplication végétative et reproduction sexuée.

Elles se reproduisent le plus souvent par **multiplication végétative**, au cours de laquelle chaque cellule donne naissance à deux cellules filles, par écartement des deux valves et régénération de nouvelles valves de plus petite taille. Ce processus conduit à la réduction progressive de la taille des cellules au fil des générations jusqu'à l'atteinte d'une taille minimale (**Figure 9**).

La **reproduction sexuée**, induite par la réduction de taille de la cellule mais aussi par les facteurs environnementaux (lumière, température, nature du substrat, etc.), permet la restauration d'individus de taille normale. Les modalités de cette reproduction sexuée varient selon les espèces, mais l'auxosporulation (production d'auxospore ou cellule "œuf") est toujours observée (**Figure 10**).

A-1.3. Classification

La classification des diatomées est basée sur les caractéristiques morphologiques du frustule en vue valvaire (de face) et en vue connective (de profil), et sur l'ornementation des valves (stries, pores, ponctuations, etc. au travers desquels se font les échanges entre le protoplasme de la cellule et le milieu extérieur). Ces caractères morphologiques sont extrêmement variables selon les espèces, mais restent permanents au sein d'une même espèce, transmissibles d'une génération à l'autre. L'élimination par traitement chimique du protoplasme des cellules et de la couche extérieure de matières organiques permet d'observer les détails des frustules au microscope photonique.

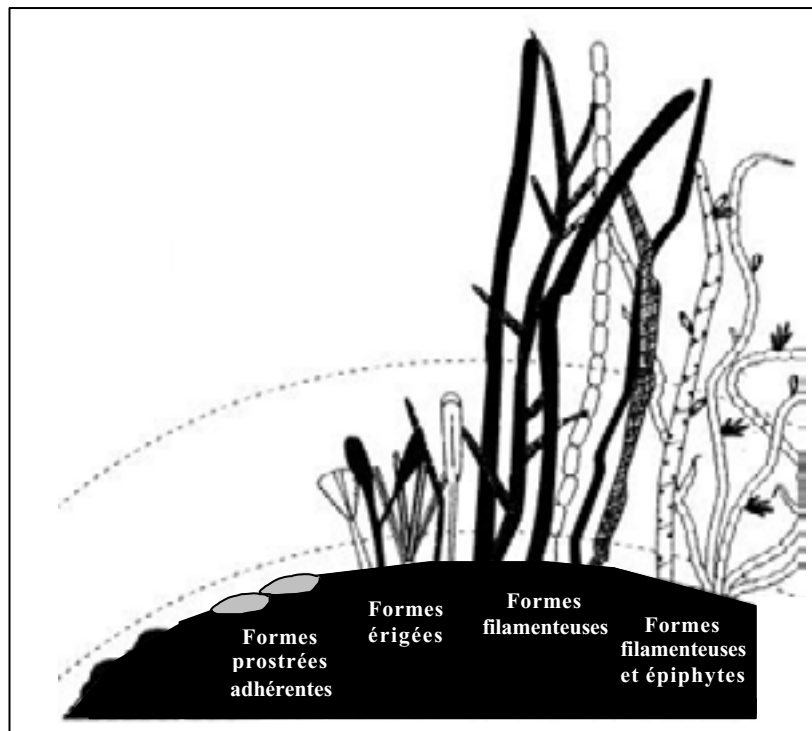


Figure 12 : Les différentes "formes de croissance" des diatomées périphytiques (d'après Steinman 1996, modifié).

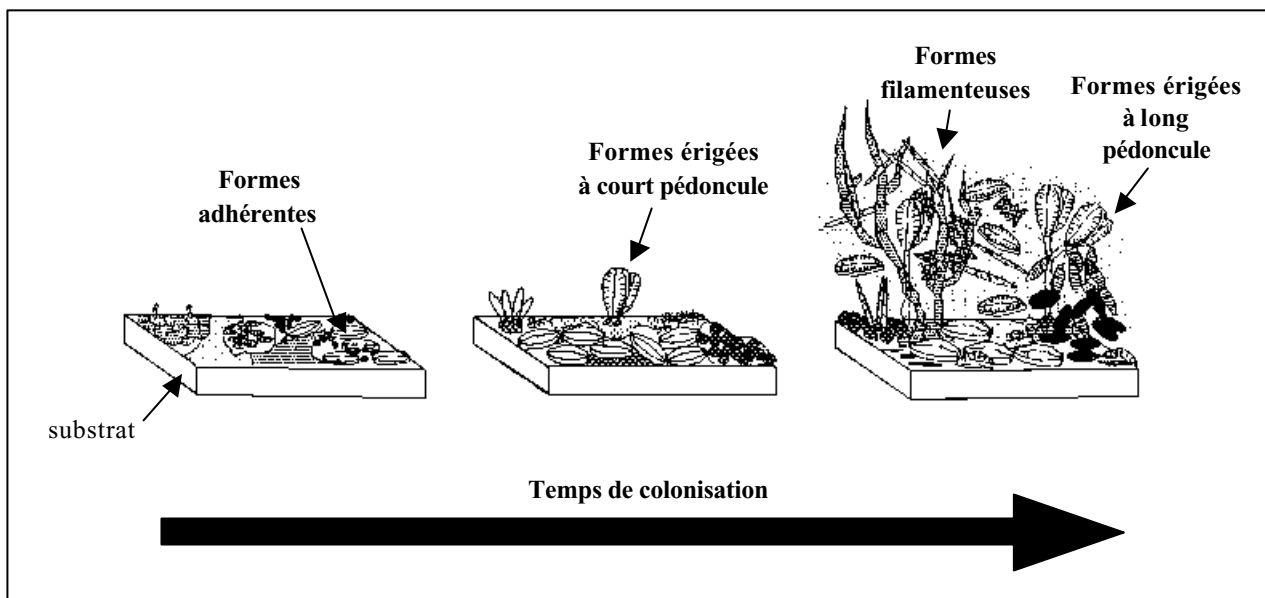


Figure 13 : Processus de colonisation progressive des substrats aquatiques par les différentes "formes de croissance" de diatomées.

Les classifications des diatomées sont abondantes et ont fait l'objet de révisions successives (Hustedt 1930, Bourrelly 1981, Germain 1981, Krammer and Lange-Bertalot 1986, 1988, 1991a, 1991b, Round *et al.* 1990). La classification de Krammer et Lange-Bertalot (1986), sur laquelle nous nous sommes appuyés, est présentée dans la **Figure 11**. Elle distingue deux ordres de diatomées : les **Centrales**, ou Centriques, à symétrie axiale et portant des ornements radiales ou concentriques, et les **Pennales**, ou Pennées, à symétrie bilatérale, qui peuvent posséder une ligne interrompant les stries (pseudo-raphé) ou une fente longitudinale (raphé).

A-1.4. Répartition et modes de vie

Le groupe des diatomées possède une **grande amplitude écologique**, ces micro-algues étant capables de coloniser tous les types de milieux aquatiques continentaux et marins, même les plus inhospitaliers et les plus pollués (mares temporaires, sources thermales, glace, bouées enduites de peinture antifouling, etc.).

Les diatomées présentent deux modes de vie différents, une partie des espèces étant **planctonique** alors que les autres sont **périphytiques**. Les diatomées planctoniques, appartenant aux Centriques pour la plupart, vivent en suspension dans la colonne d'eau et constituent la majeure partie du phytoplancton lacustre et marin. Elles ont une importance écologique considérable, contribuant à près de 25 % de la production primaire totale de la planète (Werner 1977). Contrairement aux espèces planctoniques, les diatomées périphytiques ont un mode de vie benthique, et se développent à la surface des substrats immergés en zone photique. Elles sont constituées principalement d'espèces Pennées, et sont généralement responsables d'une forte proportion de la production primaire au sein des cours d'eau, où le compartiment phytoplanctonique est peu développé, voire absent, en raison du courant (Whitton 1980).

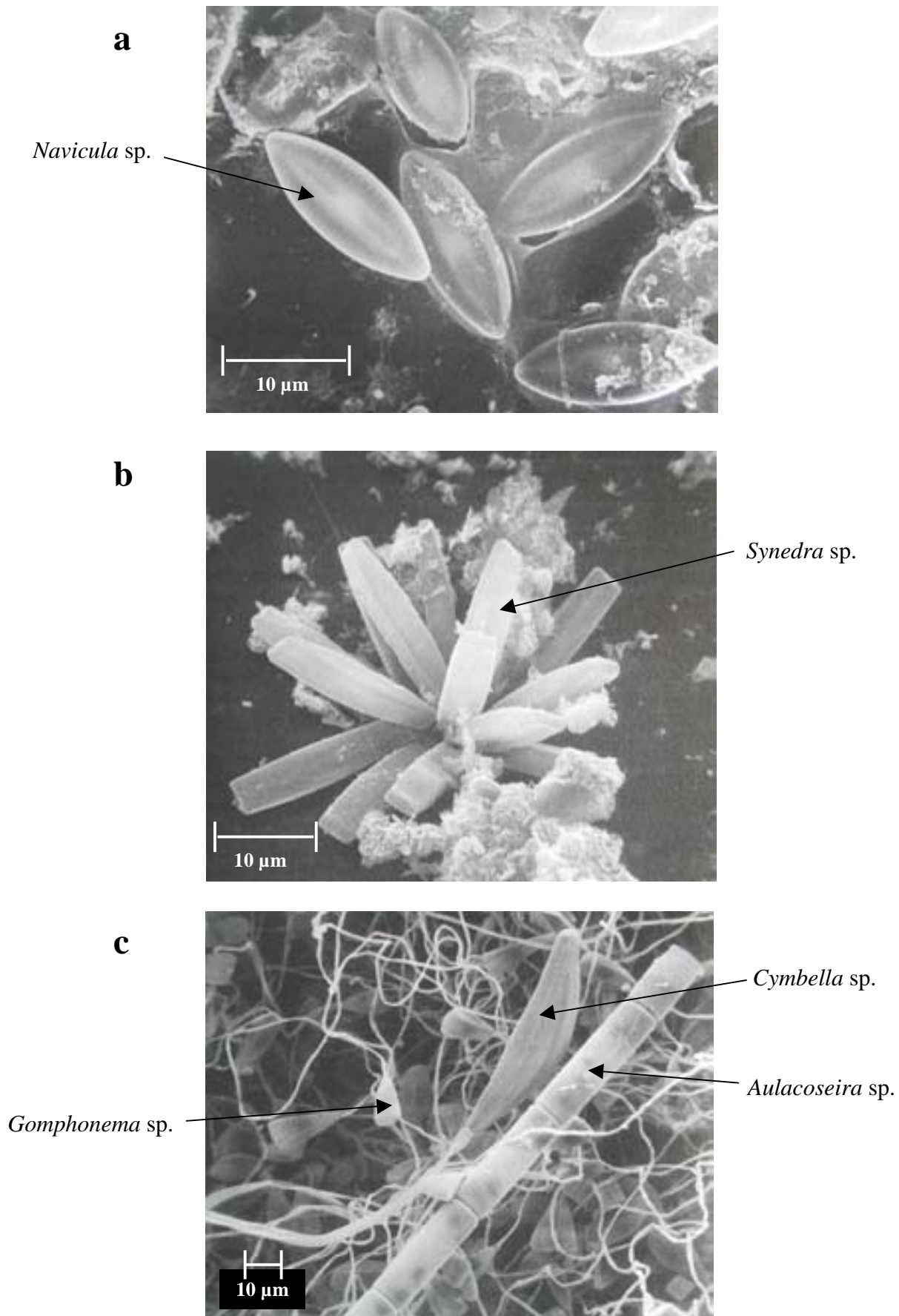


Figure 14 : Photographies des différentes "formes de croissance" des diatomées périphytiques d'après des observations au microscope électronique à balayage :

- (a) espèces adhérentes ;
 - (b) espèces érigées, rattachées au substrat par leur partie apicale ;
 - (c) espèces à long pédoncule et espèces filamenteuses
- (d'après Stevenson 1996, modifié).

A-2. STRUCTURE DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES : variabilité selon les habitats et intérêts pour la bioindication des cours d'eau

A-2.1. Un développement progressif en trois dimensions

Les communautés de diatomées périphytiques se développent sur les substrats par accumulation progressive de strates d'algues possédant des "**formes de croissance**" différentes (Round 1981, Roemer *et al.* 1984, Hoagland *et al.* 1993, Müller 1999) (**Figures 12 et 13**).

La colonisation d'un substrat vierge débute par la formation d'une matrice de matières organiques et de bactéries. Les petites diatomées **adhérentes** (ex. *Cocconeis placentula* ou *Navicula* sp., **Figure 14 a**), accolées très étroitement au substrat par toute leur surface valvaire, sont les premières formes à se déposer sur le substrat (Biggs 1996, Johnson *et al.* 1997). Des espèces **érigées**, rattachées au substrat par leur partie apicale (ex. *Fragilaria capucina* var. *vaucheriae* ou *Synedra* sp., **Figure 14 b**) ou par un très court pédoncule (ex. *Achnantheidium minutissimum*), forment également la couche algale basale du biofilm.

Par la suite se développent des espèces moins fortement rattachées au substrat, par l'intermédiaire de sécrétions mucilagineuses organisées en longs tubes ou pédoncules (ex. *Cymbella* ou *Gomphonema* sp., **Figure 14 c**). Ces espèces au développement rapide sont les premières formes à recouvrir les diatomées adhérentes.

Lorsque les conditions du milieu le permettent, une troisième strate d'algues apparaît sur le substrat, constituée d'espèces **filamenteuses** (ex. *Melosira varians* ou *Aulacoseira* sp., **Figure 14 c**) qui recouvrent les espèces adhérentes et les espèces érigées. Ces algues se développent généralement plus tardivement, s'imbriquant dans la matrice d'algues et de matières organiques déposée sur le substrat, mais n'ayant pas de lien direct avec celui-ci. Avec l'apparition des espèces filamenteuses, la communauté atteint une architecture très épaisse en trois dimensions, qualifiée de **mature**.

Les communautés périphytiques renferment également des diatomées **mobiles** (ex. *Nitzschia palea*), unicellulaires pour la plupart, capables de se déplacer à travers les couches supérieures du biofilm grâce aux substances polysaccharidiques qu'elles excrètent (Stevenson 1996, Johnson *et al.* 1997), et des espèces **planctoniques** (ex. *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis* ou *Stephanodiscus hantzschii*), piégées dans la matrice du biofilm (Roemer *et al.* 1984).

Au fur et à mesure du développement de la communauté périphytique, l'épaisseur du biofilm s'accroît sur le substrat, en même temps que sa complexité et son métabolisme interne.

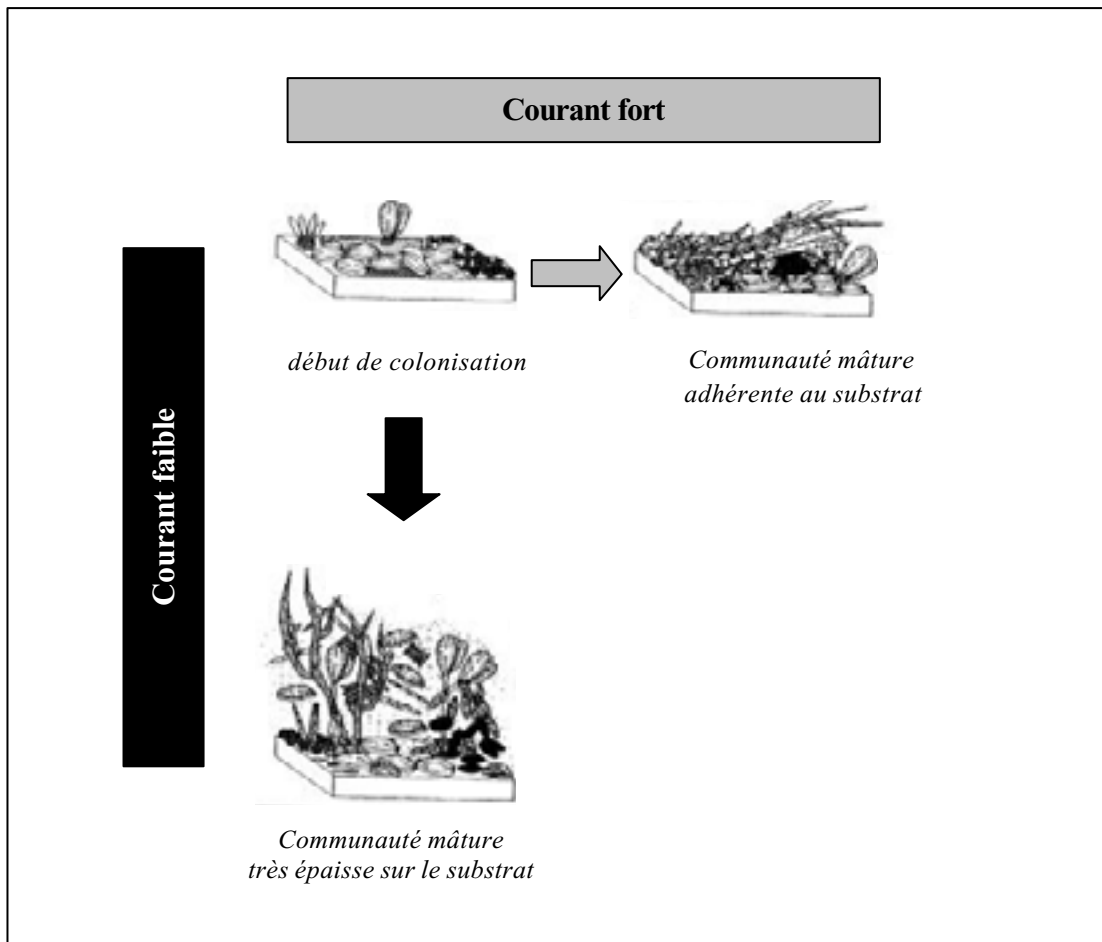


Figure 15 : Influence du courant sur le développement et la structure des communautés de diatomées périphtiques.

La **matrice organique** constituée des sécrétions polysaccharidiques des bactéries et des algues s'épaissit également, et modifie les interactions physico-chimiques entre le milieu aquatique environnant et le périphyton. Ainsi, elle protège les cellules sous-jacentes des effets érosifs du courant, mais les expose à une limitation des ressources en nutriments et en lumière, qui diffusent moins facilement à travers le biofilm et sont utilisées par les organismes des strates supérieures (Stevenson *et al.* 1991). Plusieurs auteurs ont même émis l'hypothèse selon laquelle cette matrice organique, qui possède de nombreux sites de fixation des métaux lourds (Rose and Cushing 1970, Freeman and Lock 1995, Gray *et al.* 2001), pouvait réduire la biodisponibilité et la toxicité de ces métaux vis-à-vis des organismes périphytiques situés à l'intérieur du biofilm (Lock *et al.* 1984, Ivorra *et al.* 2000 a).

Toutefois, l'atteinte d'une architecture épaisse en trois dimensions des communautés périphytiques dépend des facteurs environnementaux, qui déterminent le nombre et la nature des espèces présentes dans le cours d'eau et leur capacité à se déposer et à se développer sur les substrats.

A-2.2. Une grande sensibilité aux facteurs environnementaux

De nombreuses études ont montré que les facteurs environnementaux tels que la vitesse du courant, la température, les ressources en nutriments et la lumière avaient une influence importante sur l'évolution et la structure des communautés de diatomées périphytiques (Patrick 1971, Stevenson 1983, Luttenton and Rada 1986, Robinson and Rushforth 1987, Steiman and McIntire 1986, Bothwell *et al.* 1989, Stevenson *et al.* 1991, Humphrey and Stevenson 1992, De Nicola 1996, Hill 1996, Ghosh and Gaur 1998, Fayolle *et al.* 1999). La nature du substrat détermine également des communautés périphytiques différentes, selon que les espèces se développent à la surface ou dans le sédiment (communautés appelées épipélon et endopélon), sur des grains de sable (épipsammon), sur des substrats durs et inertes de type pierres-blocs-galets (épilithon), ou à la surface de végétaux aquatiques (épiphyton) (Prygiel and Coste 2000).

La structure des communautés est ainsi variable dans l'espace, d'un habitat à l'autre, mais aussi dans le temps, selon les variations saisonnières et annuelles des conditions physico-chimiques au sein d'un même habitat. Medley and Clements (1998) ont montré que l'architecture des communautés de diatomées variait de l'amont vers l'aval des rivières, en relation avec les variations des facteurs environnementaux. Les communautés qui se développent en amont sont soumises à des turbulences intenses, à des apports limités en

**CARACTERISTIQUES
DES COMMUNAUTES DE
DIATOMEES
PERIPHYTIQUES**

Large répartition géographique



Application large

Organismes autotrophes



Base des réseaux trophiques

Grande diversité d'espèces
Flore abondante



Source d'informations riche

Mode de vie fixé aux substrats



Intégration des conditions de l'habitat

Cycle de développement court



Réponse rapide

Taille microscopique



Echantillonnage facile et rapide

Préparation et comptages fastidieux
Nécessité d'un bon microscope
Identification difficile

AVANTAGES

INCONVENIENTS

Table 1 : Principaux avantages et inconvénients relatifs à l'utilisation des communautés de diatomées périphytiques pour l'évaluation biologique de la qualité de l'eau des rivières (d'après Coste 1994, modifié).

nutriments et à des eaux froides. Elles ont généralement une structure fine en trois dimensions, et sont dominées par les petites espèces adhérentes (Oemke and Burton 1986, Medley and Clements 1998). A l'opposé, les communautés qui se développent à l'aval des rivières, et qui sont moins souvent exposées à des turbulences, atteignent des épaisseurs plus importantes sur les substrats et présentent une structure complexe en trois dimensions (**Figure 15**).

A-2.3. De nombreuses potentialités pour l'évaluation biologique de la qualité de l'eau

Les communautés de diatomées périphytiques présentent de nombreuses **qualités pour être utilisées en tant que bioindicateurs** (Mc Cormick and Cairns 1994, Lowe and Pan 1996) (**Table 1**). Elles colonisent tous les types de milieux aquatiques, où elles occupent une position clé à la base des chaînes alimentaires en tant que producteurs primaires. Elles constituent une grande source d'informations sur les caractéristiques de l'habitat dans lequel elles se développent, fixées aux substrats immergés, car elles sont composées d'un grand nombre d'individus et d'espèces avec des préférences écologiques variées vis-à-vis des facteurs environnementaux. De plus, leur cycle de développement très court (quelques heures à quelques jours) (Baars 1983) leur confère un temps de réponse rapide face aux variations du milieu. Cependant, l'utilisation des communautés de diatomées comme outil d'évaluation de la qualité du milieu présente aussi un certain nombre d'inconvénients, l'identification des espèces nécessitant des préparations et des comptages fastidieux, la possession d'un microscope de bonne qualité et la maîtrise de la systématique de ce groupe, qui requiert un long apprentissage.

Plus d'une vingtaine de **méthodes permettant d'évaluer la qualité des eaux** à partir de l'analyse des communautés de diatomées périphytiques ont été développées en Europe (Prygiel and Coste 1995). Ces méthodes sont basées sur des informations relatives aux *preferenda* écologiques des différentes espèces de diatomées, issues de corrélations établies en milieu naturel entre les communautés observées dans de nombreux habitats et les caractéristiques environnementales de ces habitats. Elles peuvent être répertoriées selon l'objectif qu'elles poursuivent : les méthodes de type saprobique traduisent l'enrichissement en matières organiques biodégradables du milieu (Lange-Bertalot 1979, Sladeczek 1986) ; les méthodes de type trophique concernent l'enrichissement en substances nutritives (phosphore et azote) (Kelly and Whitton 1995, Kelly 1998) ; d'autres méthodes visent à exprimer l'acidification des eaux (Ter Braak

and Van Dam 1989) ou ont pour objectif l'évaluation de la qualité générale du milieu (Descy and Coste 1991). Ces dernières intègrent les informations concernant les matières organiques, les substances nutritives ainsi que divers paramètres tels que les chlorures, la conductivité et le pH. En France, les Agences de l'Eau ont récemment développé en collaboration avec le Cemagref un indice diatomique permettant d'évaluer la qualité générale de l'eau, à l'usage des gestionnaires et applicable à l'ensemble du réseau hydrographique français. Cet indice (Indice Biologique Diatomées, IBD) (Coste 1998, Prygiel and Coste 2000) a fait l'objet en 2000 d'une norme Afnor homologuée (N° NF T 90-354, AFNOR 2000).

De nombreuses applications de ces méthodes ont été réalisées en Europe et en Amérique du Nord (Coste and Ayphasshoro 1991, Whitton *et al.* 1991, Coste *et al.* 1995, Whitton and Rott 1996, Prygiel *et al.* 1999, Stevenson and Bahls 1999, Hill *et al.* 2000 b), grâce notamment au développement de logiciels de calcul des indices diatomiques, tels que le programme "OMNIDIA" (Lecoite *et al.* 1993). Ces applications montrent qu'aucune méthode ne peut être actuellement généralisée sans adaptation préalable.

*Précisons que les méthodes basées sur les communautés de diatomées périphytiques pour évaluer la qualité des eaux, élaborées à partir d'observations de terrain, ont très rarement fait l'objet de **validations expérimentales** (Cox 1993).*

*En ce qui concerne la **pollution métallique**, les nombreuses études de terrain décrites dans la littérature mettent en évidence des variations marquées de la composition spécifique des communautés de diatomées périphytiques le long de gradients de pollution métallique, comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Cependant, aucune méthode basée sur les communautés de diatomées n'a été développée jusqu'à présent pour évaluer le niveau de pollution métallique des cours d'eau, et très peu d'études expérimentales ont été entreprises en laboratoire pour valider les observations réalisées in situ.*

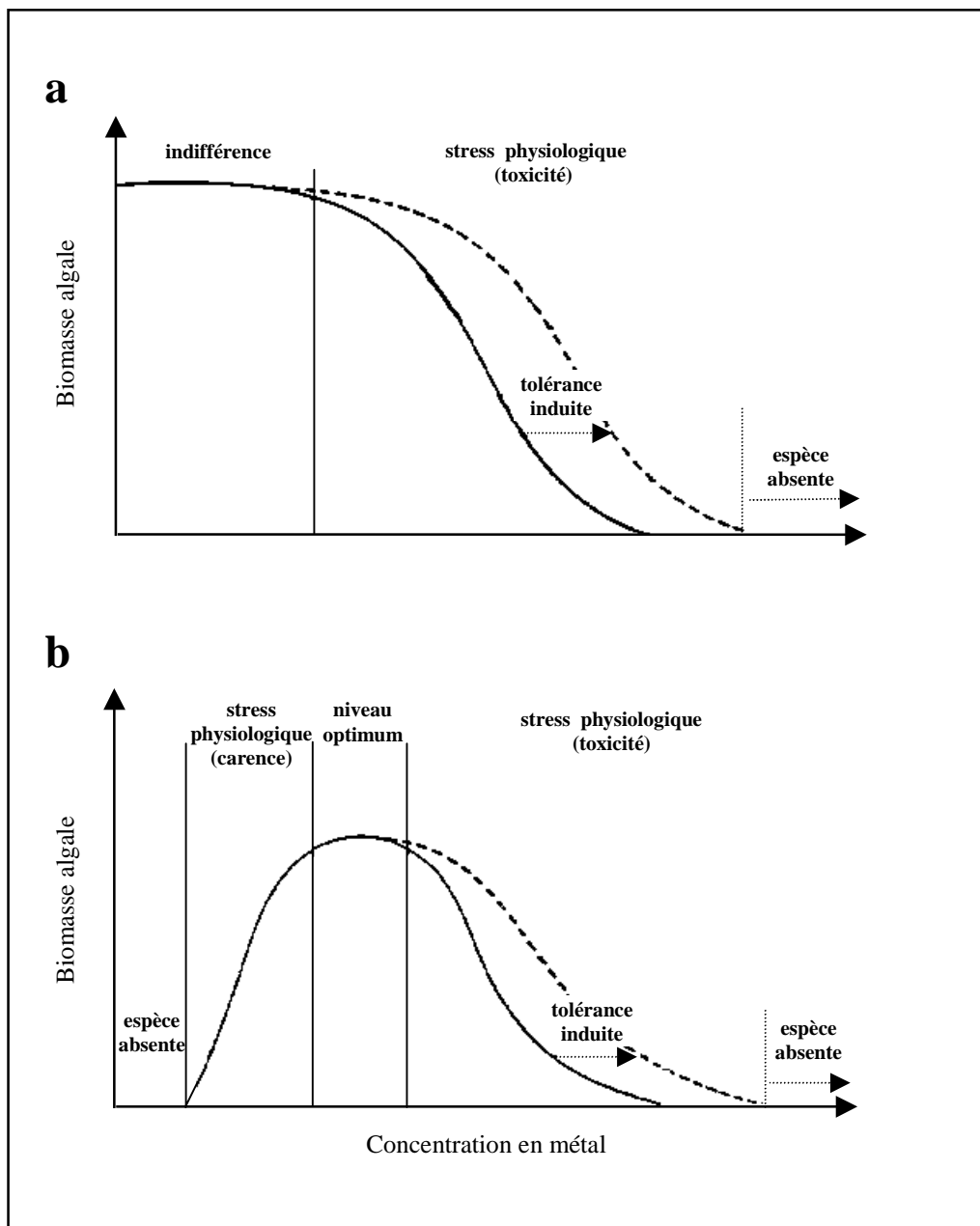


Figure 16 : Réponses des algues à une augmentation de la concentration en métaux lourds dans le milieu : **(a)** métaux "non-essentiels" ; **(b)** métaux "essentiels" (d'après De Filippis and Pallaghy 1994, modifié).

**B- LES EFFETS DES POLLUTIONS METALLIQUES
SUR LES DIATOMEES PERIPHYTIQUES :
de nombreux travaux menés jusqu'à présent
aux différents niveaux d'intégration biologique
mais encore peu de résultats utilisables pour la bioindication**

Les métaux existent à l'état naturel dans l'ensemble des compartiments de l'écosphère, dans des concentrations généralement faibles. Cependant, sous l'action des activités anthropiques, la contamination des systèmes aquatiques peut devenir importante, et constituer un risque pour la biocénose (Nriagu and Pacyna 1988, Nriagu 1996).

La bibliographie disponible concernant les effets des métaux sur les diatomées couvre les **différents niveaux biologiques d'intégration**, depuis la base cellulaire, voire moléculaire, jusqu'à l'échelle des communautés. Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, certains auteurs ont étudié les mécanismes cellulaires de toxicité des métaux, alors que d'autres ont évalué leurs effets sur les populations algales (croissance, activité photosynthétique), ou sur les communautés (structure, fonction).

Deux types de métaux peuvent être distingués par rapport aux activités métaboliques des êtres vivants : (i) les **métaux "non-essentiels"**, comme le mercure, le cadmium ou le plomb, qui produisent des effets toxiques lorsqu'ils dépassent une certaine concentration dans le milieu, entraînant par exemple une réduction de croissance des populations algales (**Figure 16**) ; (ii) les **métaux "essentiels"**, comme le cuivre, le fer ou le zinc, qui exercent des effets délétères sur la croissance algale en cas de trop forte concentration (toxicité), lorsque les capacités de régulation de la cellule sont dépassées, mais aussi en cas de trop faible concentration (carence), ces métaux constituant des oligoéléments indispensables au fonctionnement des cellules (De Filippis and Pallaghy 1994, Depledge *et al.* 1994) (**Figure 16**). Cependant, des métaux "non-essentiels" peuvent, dans certaines conditions, avoir des effets bénéfiques pour la survie d'une espèce. Lee *et al.* (1995) ont par exemple montré qu'une faible concentration en cadmium dans un milieu carencé en zinc pouvait restaurer 90 % de la croissance de la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*.

Rappelons que la toxicité des métaux présents dans les biotopes aquatiques dépend de leur biodisponibilité à l'égard des organismes, qui est conditionnée par les phénomènes de "spéciation chimique" qu'ils subissent en se complexant aux nombreux ligands inorganiques

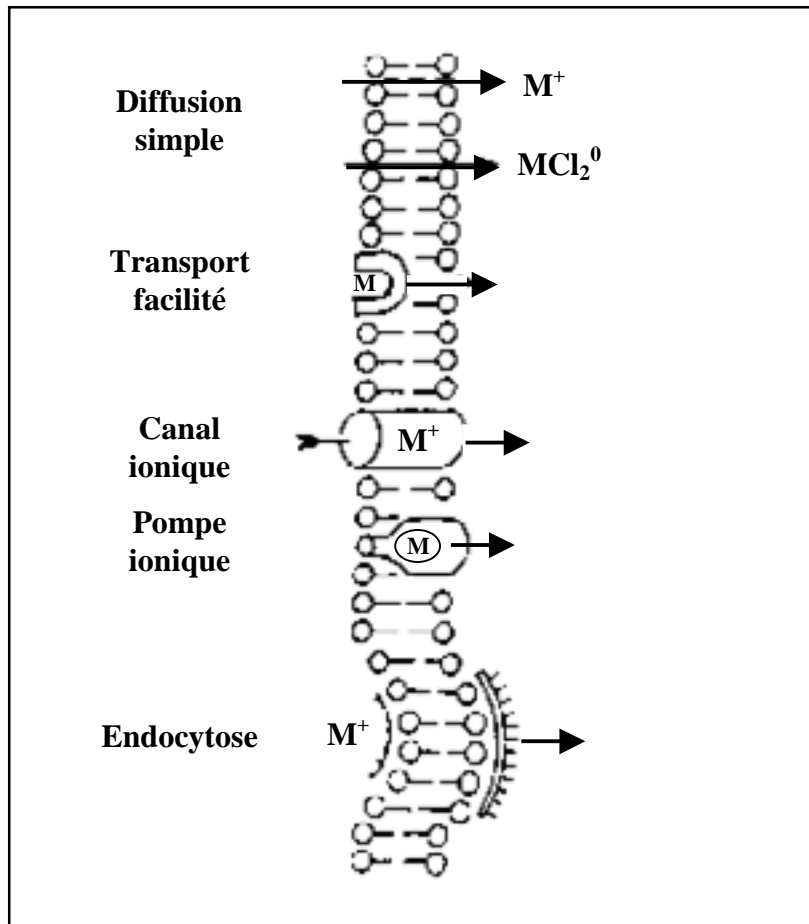


Figure 17 : Les différents mécanismes de transport des métaux à travers les membranes biologiques (d'après Simkiss and Taylor 1989, modifié).

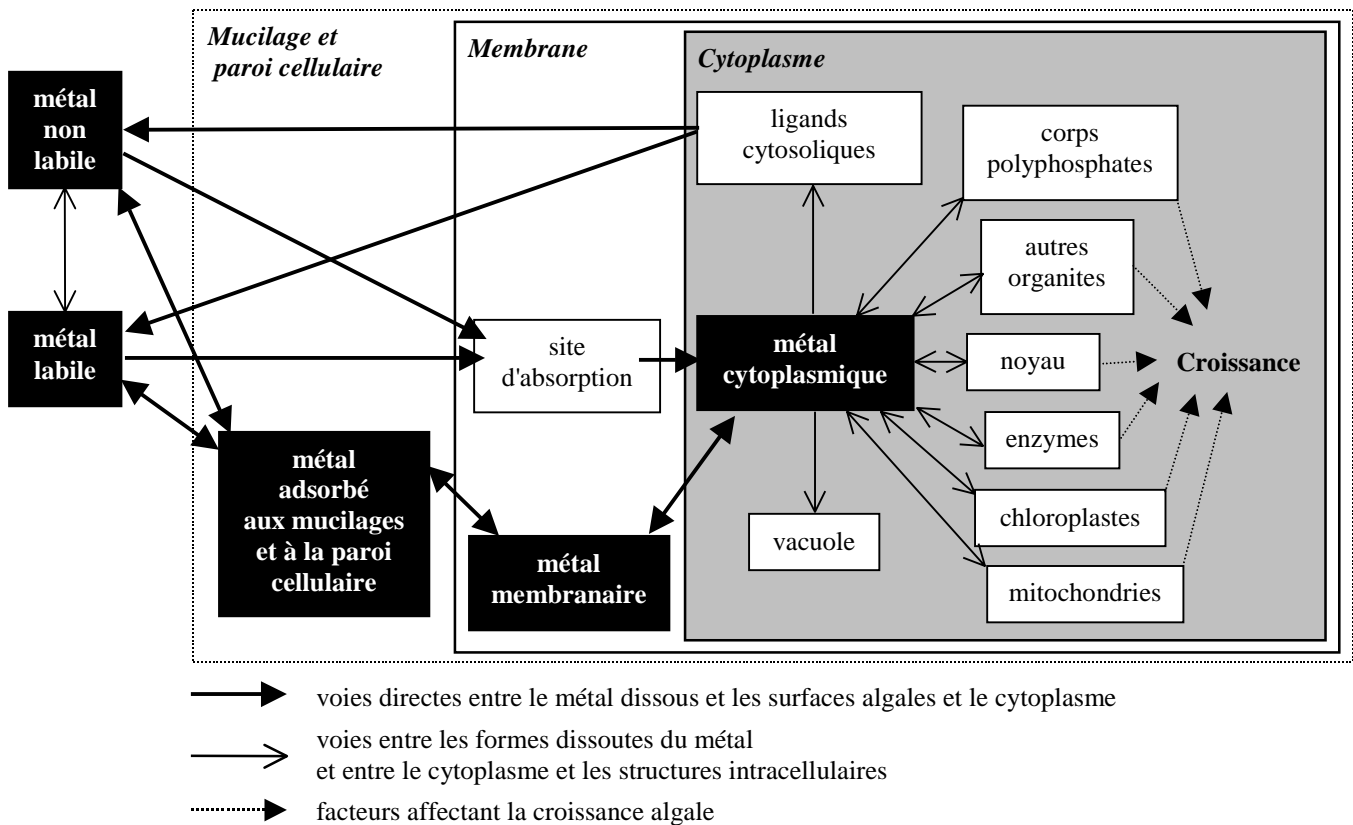


Figure 18 : Modèle schématique du devenir d'un métal absorbé par une cellule algale. (d'après Genter 1996, modifié).

ou organiques présents dans la phase dissoute ou particulaire de la colonne d'eau (Bernhard *et al.* 1986, Campbell *et al.* 1988).

B-1. ETUDES CELLULAIRES

B-1.1. Mécanismes de toxicité

Les algues possèdent généralement de fortes capacités d'accumulation des métaux, particulièrement sous forme dissoute, en raison du rapport élevé entre la surface et le volume cellulaire qui facilite l'**adsorption** du métal à l'interface avec le milieu environnant. L'**absorption** des métaux à l'intérieur de la cellule fait ensuite intervenir différents mécanismes de transport : (i) des mécanismes passifs, par diffusion simple au travers de la membrane plasmique et des enveloppes cellulaires externes ; (ii) des mécanismes facilités, par l'intervention de protéines transporteurs ou de canaux ioniques, suivant le gradient de concentration ; (iii) des mécanismes de transport actif, nécessitant une consommation d'énergie, contre le gradient de concentration ; (iv) des mécanismes d'endocytose (Sorrentino 1979, Rai *et al.* 1981, Simkiss and Taylor 1989, Genter 1996) (**Figure 17**).

A l'intérieur de la cellule, les métaux agissent sur les **systèmes enzymatiques** contrôlant les fonctions biochimiques et physiologiques de l'algue, comme la photosynthèse, la respiration, la division cellulaire, l'assimilation des nutriments et la synthèse des macromolécules biologiques (Rai *et al.* 1981, Genter 1996) (**Figure 18**).

Conway (1978) a montré qu'un ajout de cadmium à des cultures de la diatomée *Asterionella formosa* induisait une diminution de la **concentration en pigments** et perturbait le **système des perméases**, qui est à l'origine du transport des phosphates et de la silice à l'intérieur de la cellule. Fisher and Jones (1981) ont mis en évidence que le cuivre et le zinc réduisaient l'**absorption de l'acide silicilique** et la **synthèse des acides aminés** chez la diatomée *Asterionella japonica*. L'apparition de **frustules déformés** de diatomées a été rapportée dans plusieurs cours d'eau contaminés par les métaux (Besch *et al.* 1972, McFarland *et al.* 1997, Dickman 1998, Prygiel and Coste 2000), et pourrait être liée à ces perturbations du métabolisme de la silice (**Figure 19**). Différents auteurs ont d'ailleurs évoqué la potentialité d'utiliser ces formes anormales en tant qu'indicateur de la pollution métallique (U.S. E.P.A.

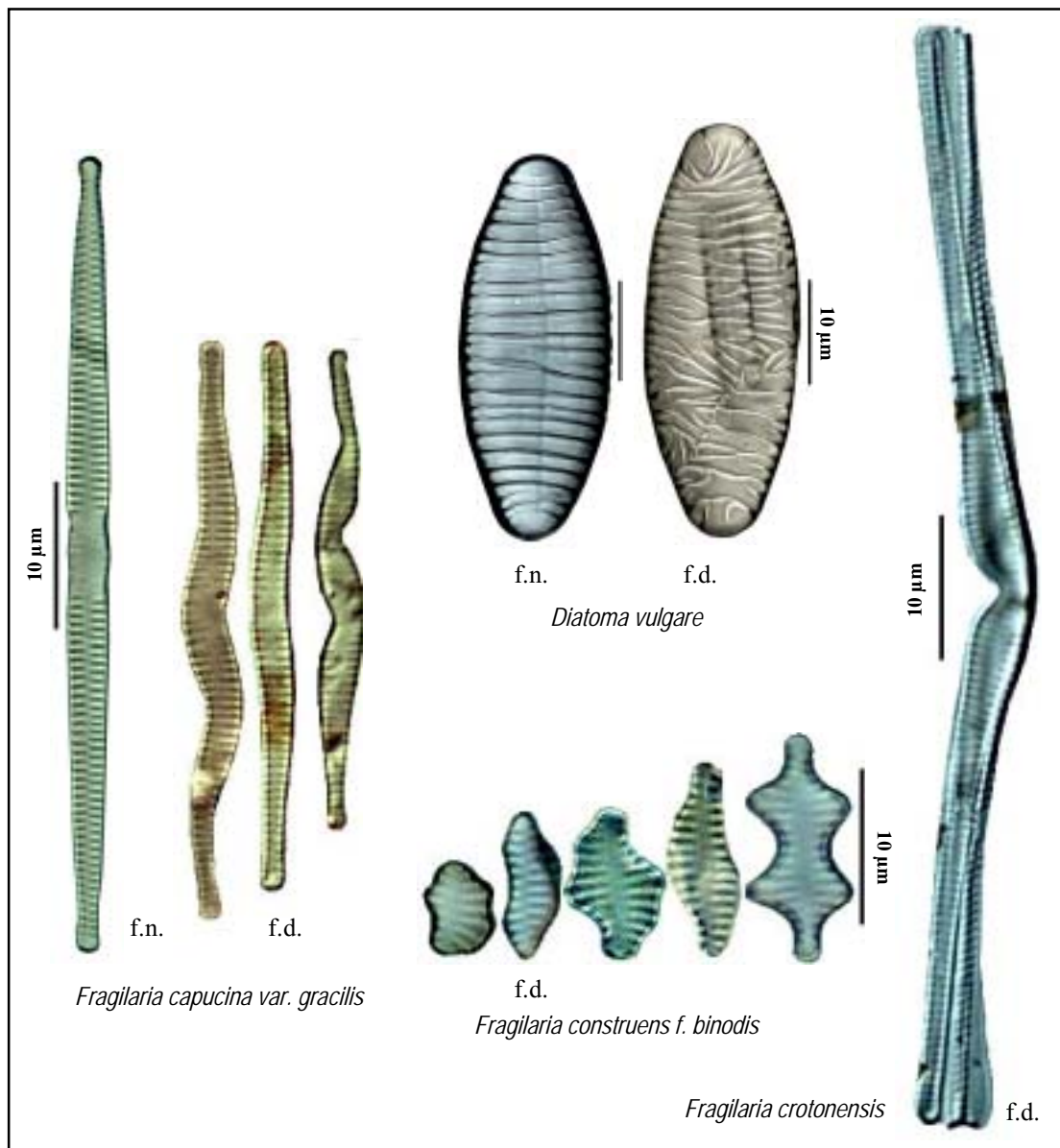


Figure 19 : Microphotographies de frustules déformés de diatomées, trouvés dans des milieux contaminés par les métaux lourds (f.n. = forme normale, f.d. : forme déformée) (source : Michel Coste).

2001), mais leur très faible occurrence au sein des communautés naturelles semble rendre une telle application difficile.

Soulignons que les **facteurs physico-chimiques** du milieu, comme la température de l'eau, les concentrations en nutriments, le pH, la dureté, etc., influencent de façon importante la toxicité des métaux vis-à-vis des micro-algues (Genter 1996, Wang and Dei 2001). Par exemple, les effets toxiques des métaux peuvent être atténués lorsque le pH diminue, les ions H^+ entrant en compétition avec les ions métalliques pour les sites d'adsorption à la surface des cellules algales. L'augmentation de la dureté de l'eau peut également entraîner une diminution de la toxicité des métaux, ces derniers étant en compétition avec les ions calcium, magnésium et manganèse pour les sites d'adsorption membranaires, et pouvant se complexer et précipiter avec les carbonates, les bicarbonates et les hydroxydes de calcium et de magnésium présents dans le milieu.

B-1.2. Mécanismes de tolérance

Différents mécanismes peuvent être développés physiologiquement ou génétiquement par les algues pour accroître leur tolérance au stress métallique, comme la diminution du nombre de **sites de fixation** des métaux à la surface cellulaire, **l'inhibition de l'absorption** des métaux, le développement de mécanismes d'**exclusion**, de mécanismes de **détoxication** interne et de **sites de stockage** (Rai *et al.* 1981, Genter 1996).

Parmi les mécanismes de stockage et de détoxication, les algues peuvent synthétiser des polypeptides intracellulaires riches en cystéine capables de lier les métaux. Ces polymères, appelés **phytochélatines**, jouent un rôle comparable à celui des méthallothionéines chez les espèces animales. L'induction par les métaux de la synthèse de phytochélatines a été identifiée chez différentes espèces de diatomées marines, en relation avec une augmentation de la tolérance aux métaux de ces algues (Ahner and Morel 1995, Ahner *et al.* 1995, Morelli and Scarano 1995, Morelli and Pratesi 1997, Torres *et al.* 1997, Morelli and Scarano 2001). Lee *et al.* (1996) ont même mis en évidence l'apparition d'un export de complexes constitués de cadmium et de phytochélatines chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*, en présence de fortes concentrations en cadmium.

B-2. ETUDES DE POPULATIONS

Plusieurs études ont été menées pour évaluer l'**accumulation des métaux** par des populations de diatomées, au sein de cultures monospécifiques (Conway 1978, Braek *et al.* 1980, Dongmann and Nürnberg 1982, Guanzon *et al.* 1995, Sunda and Huntsman 1998, Chang and Reinfelder 2000, Schmitt *et al.* 2001, Wang and Dei 2001). D'autres travaux ont été réalisés sur des cultures de diatomées, pour quantifier l'**inhibition de croissance ou de photosynthèse** provoquée par différentes concentrations de métaux (Jensen and Rystad 1974, Berland *et al.* 1977, Conway 1978, Conway and William 1979, Braek *et al.* 1980, Wong *et al.* 1982, Rachlin *et al.* 1983, Wong 1987, Takamura *et al.* 1989, Guanzon *et al.* 1994, Il'yash *et al.* 1997, Payne and Price 1999).

Cependant, ces études au niveau de populations ont principalement concerné des **diatomées marines planctoniques**, au détriment des espèces périphytiques d'eau douce difficiles à maintenir en culture au laboratoire, et leur nombre reste très limité par rapport aux travaux effectués sur des algues vertes. De plus, les conditions dans lesquelles ont été menées ces expériences étant très éloignées de celles du milieu naturel (populations algales cultivées en suspension, dans un milieu très riche en sels nutritifs), l'extrapolation des résultats reste délicate.

Ces travaux ont tout de même permis de mettre en évidence l'existence de phénomènes d'**adaptation aux métaux** chez différentes espèces d'algues vertes et de diatomées. En effet, plusieurs auteurs ont montré, avec des tests d'inhibition de croissance ou de photosynthèse, que des souches provenant d'environnements pollués par les métaux présentaient une tolérance aux métaux nettement plus importante que des souches de la même espèce provenant de sites non pollués (Jensen and Rystad 1974, Harding and Whitton 1976, Say *et al.* 1977, Foster 1982, Wang 1986, Takamura *et al.* 1989, Jin *et al.* 1996, Ivorra *et al.* 2000 b). Cet accroissement de la tolérance chez des populations préalablement soumises à une pollution métallique peut s'expliquer par le développement de **mécanismes de tolérance**, évoqués précédemment, ou par la sélection naturelle des génotypes présentant une meilleure tolérance au sein de la population, mais ces hypothèses restent à confirmer.

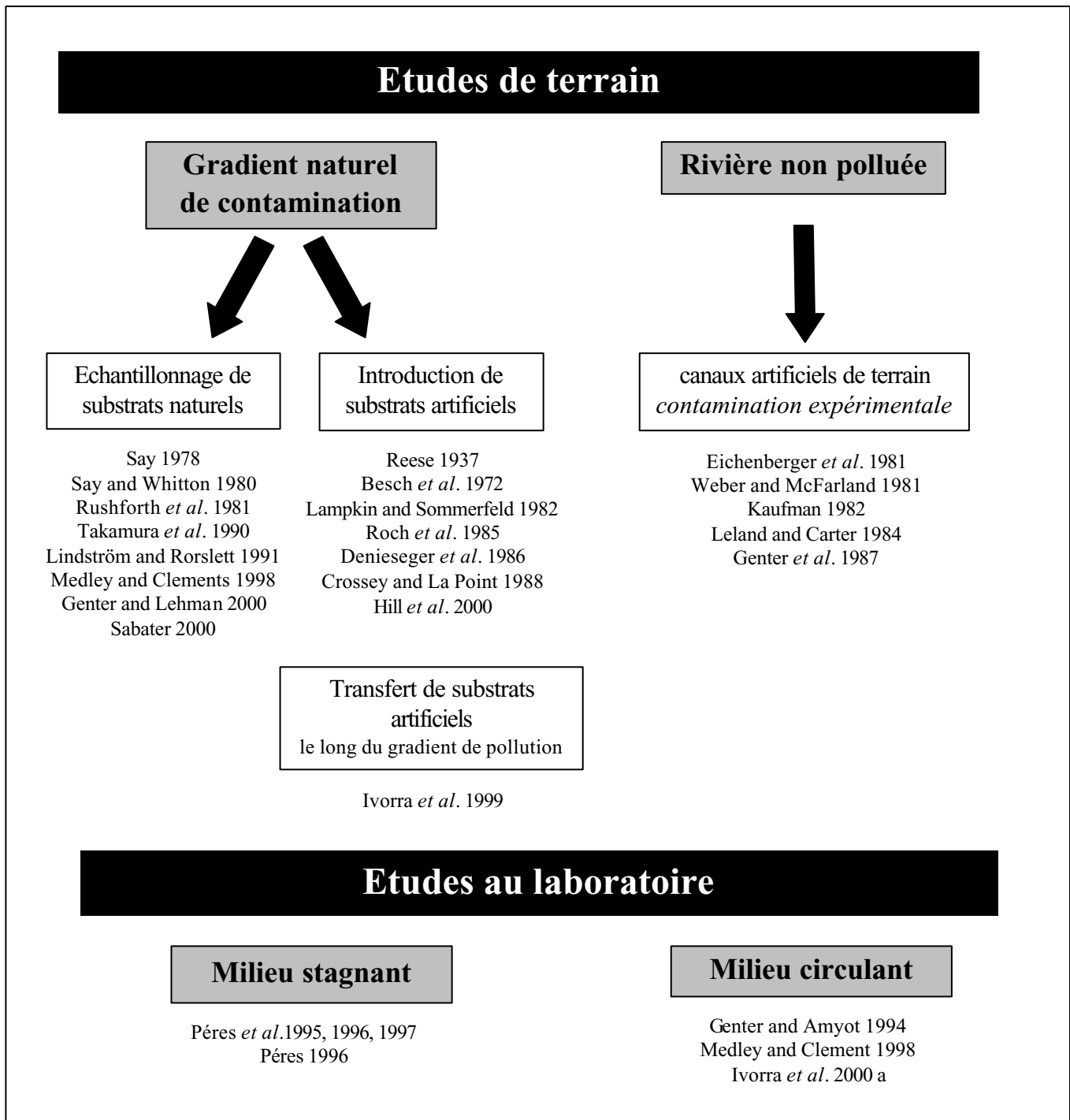


Figure 20 : Schéma de synthèse des principales études menées jusqu'à présent pour évaluer les effets des pollutions métalliques sur la structure des communautés de diatomées périphytiques.

B-3. ETUDES DE COMMUNAUTES

L'étude de la toxicité des métaux au niveau des communautés de diatomées permet de se situer dans des conditions plus représentatives de la complexité du milieu naturel, en intégrant les **interactions entre espèces**, ignorées lors des études sur des cultures monospécifiques. En effet, l'abondance d'une population au sein de la communauté peut être modifiée en raison des effets directs du métal au niveau cellulaire, mais également en raison d'effets indirects dus aux interactions interspécifiques (compétition).

De nombreux auteurs ont étudié les **réponses fonctionnelles** des communautés périphytiques face aux polluants métalliques, principalement au niveau de leur activité photosynthétique (Admiraal *et al.* 1999, Blanck and Wängberg 1988 a and b, Colwell *et al.* 1989, Niederlehner and Cairns 1992, Gustavson and Wängberg 1995, Lehman *et al.* 1999, Paulsson *et al.* 2000, Soldo and Behra 2000). Les résultats de ces études valident pour la plupart l'hypothèse émise par Blanck *et al.* (1988), selon laquelle l'exposition prolongée à un polluant augmenterait la **tolérance globale de la communauté** à ce polluant (Pollution-Induced Community Tolerance, PICT), déterminée au moyen de tests photosynthétiques à court terme. D'après Blanck *et al.* (1988), ceci pourrait être lié à un remplacement des espèces sensibles par des espèces tolérantes au sein des communautés exposées à long-terme à un polluant, ainsi qu'à un remplacement des génotypes sensibles par des génotypes plus résistants au sein de certaines populations. Précisons que ces études fonctionnelles au niveau du périphyton, qui prennent en compte l'ensemble des organismes photosynthétiques du biofilm (bactéries, algues vertes, diatomées, cyanophycées, etc.), ne permettent pas d'isoler les réponses des communautés de diatomées seules.

Quelques études ont également été menées pour évaluer l'**accumulation des métaux** au niveau des biofilms périphytiques (Newman *et al.* 1985, Gray and Hill 1995, Gray *et al.* 2001). Comme pour les études fonctionnelles évoquées précédemment, ces travaux à l'échelle du périphyton prennent en compte l'ensemble de ses composantes biotiques (bactéries, micro-algues, champignons, etc.) et abiotiques (particules organiques et inorganiques), et ne permettent pas de quantifier l'accumulation au niveau des seules communautés de diatomées.

L'étude des effets de la pollution métallique sur la **structure des communautés** de diatomées périphytiques, qui correspond plus précisément au sujet de nos recherches, a fait l'objet de nombreuses observations en milieu naturel, et de quelques expérimentations en

laboratoire. Une synthèse des protocoles développés et des principaux résultats obtenus est présentée dans les deux paragraphes suivants.

B-3.1. De nombreuses études comparant la structure des communautés de diatomées le long de gradients de pollution métallique

B-3.1.1. Etudes en conditions non contrôlées

D'après nos connaissances, une vingtaine d'études de terrain auraient été menées depuis plus de cinquante ans le long de rivières présentant un gradient de pollution métallique, pour mettre en relation la structure des communautés de diatomées périphytiques et les concentrations en métaux dans le milieu (**Figure 20**).

Les communautés de diatomées périphytiques ont été échantillonnées soit sur des **substrats naturels** du lit des cours d'eau (galets, cailloux, macrophytes, etc.), soit sur des **substrats artificiels** introduits dans les rivières (lames de verre, tuiles, films plastiques, carreaux de grès, etc.). Par rapport aux substrats naturels, l'utilisation de substrats artificiels permet de collecter des communautés représentatives du passé récent du milieu, et d'homogénéiser la nature des substrats entre les différentes stations étudiées ; elle permet également de réaliser une approche comparative quantitative, puisque toutes les communautés échantillonnées ont connu une période de colonisation identique sur des substrats de surface identique.

Les résultats de ces études ont révélé des **différences de structure** entre les communautés de diatomées des stations polluées par les métaux et celles des stations non polluées, notamment au niveau de la composition spécifique. Une diminution de la richesse spécifique et/ou de la diversité des communautés a également été rapportée par plusieurs auteurs sur les stations polluées (Say 1978, Say and Whitton 1980, Lampkin and Sommerfeld 1982, Roch *et al.* 1985, Denieseger *et al.* 1986, Crossey and La Point 1988, Sabater 2000).

Des **transferts de substrats** artificiels entre des stations présentant des niveaux de pollution métallique différents ont été effectués par Ivorra *et al.* (1999), pour analyser les changements structuraux s'opérant au niveau de communautés de diatomées soumises à une pollution croissante ou décroissante. Leurs résultats ont mis en évidence une évolution systématique de la composition spécifique des communautés transférées, qui s'est rapprochée de celle des communautés résidentes.

Cependant, au cours de ces études menées en conditions non contrôlées, les différences structurales observées entre les communautés prélevées le long de gradients de pollution ne peuvent pas être interprétées comme le reflet de leur sensibilité aux métaux, étant donnée la **variabilité de nombreux autres facteurs physico-chimiques** entre les stations étudiées (courant, température, nutriments, lumière, etc.).

B-3.1.2. Etudes en conditions semi-contrôlées

Afin de standardiser les conditions environnementales entre les différents niveaux de contamination étudiés, quelques études ont été menées dans des **canaux artificiels**, connectés à une rivière non polluée et contaminés en métaux par l'expérimentateur (**Figure 20**). Ces protocoles permettent le **contrôle de certains facteurs abiotiques** (vitesse du courant, profondeur de la colonne d'eau et niveau de contamination métallique), mais ne permettent pas de prendre en compte les **mécanismes d'adaptation** aux métaux qui ont été démontrés chez plusieurs espèces de diatomées et d'algues vertes provenant d'environnements naturels pollués par les métaux (Jensen and Rystad 1974, Harding and Whitton 1976, Say *et al.* 1977, Foster 1982, Wang 1986, Takamura *et al.* 1989, Jin *et al.* 1996, Ivorra *et al.* 2000 b).

Les résultats obtenus dans ces conditions semi-contrôlées vont dans le même sens que ceux obtenus en conditions non contrôlées, en mettant en évidence des modifications de la structure des communautés de diatomées périphytiques en présence de polluants métalliques.

B-3.2. Peu d'études en laboratoire pour valider les hypothèses issues des résultats de terrain

Très peu d'études ont été menées jusqu'à présent en laboratoire, afin de confronter les résultats des études de terrain à des résultats obtenus en **conditions contrôlées** (facteurs physico-chimiques et facteurs de contamination) (**Figure 20**).

Péres (1996), au cours de sa thèse de Doctorat réalisée à l'Université Bordeaux 1 / LEESA, a étudié la cinétique de colonisation de substrats artificiels vierges au sein de **microcosmes stagnants** d'eau douce. Ses résultats ont mis en évidence un effet du cadmium et du méthylmercure sur la composition spécifique et la densité des communautés de diatomées, ainsi qu'une diminution de la taille des cellules en présence de cadmium.

D'autres auteurs ont étudié les effets des métaux au sein de **canaux artificiels de laboratoire**, soumis à un mouvement d'eau simulant le courant du milieu naturel. Medley and Clements (1998) et de Ivorra *et al.* (2000 a) ont ainsi démontré que la toxicité des métaux pouvait être différente suivant l'**architecture du biofilm**. D'après les résultats de Ivorra *et al.* (2000 a), les effets des métaux sur des communautés jeunes, très fines et adhérentes au substrat (après 2 semaines de colonisation sur le terrain), étaient plus importants que sur des communautés plus âgées et plus épaisses (après 4 semaines sur le terrain). Les études de Medley and Clements (1998) ont confirmé ces résultats, observant des atteintes plus prononcées sur des communautés provenant de l'amont de rivières, très fines, par rapport à celles observées sur des communautés de stations aval, plus épaisses. Selon Ivorra *et al.* (2000 a), ces différences de sensibilité au stress métallique en fonction de l'architecture du biofilm peuvent être reliées au **rôle protecteur de la matrice organique** développée sur les substrats. Celle-ci, possédant de nombreux sites de fixation des métaux (Rose and Cushing 1970, Lock *et al.* 1984, Freeman and Lock 1995, Gray *et al.* 2001), réduirait leur biodisponibilité et leur toxicité à l'égard des organismes périphytiques.

Les études de terrain réalisées jusqu'à présent mettent en évidence des variations marquées de la composition spécifique des communautés de diatomées périphytiques le long des gradients de pollution métallique. Cependant, les réponses des communautés de diatomées face à la pollution métallique ont très rarement fait l'objet de validations expérimentales en laboratoire. Le nombre d'études monospécifiques entreprises pour déterminer les niveaux de tolérance aux métaux des espèces de diatomées périphytiques reste également très limité.

Nos travaux ont été initiés à partir de ce constat, et ont consisté à développer une démarche méthodologique en plusieurs étapes pour évaluer les effets de la pollution métallique sur la structure des communautés de diatomées périphytiques, en associant des études menées au niveau des communautés, sur le terrain et en laboratoire, et des études au niveau des populations. Ces différentes approches sont développées dans les parties suivantes de ce mémoire.

PARTIE II

**LES BASES METHODOLOGIQUES COMMUNES
A NOS DIFFERENTES APPROCHES EXPERIMENTALES**

SOMMAIRE DE LA PARTIE II

A- LE "SITE-ATELIER" SUR LA RIVIERE LOT : à la source d'une des plus importantes pollutions métalliques (Cd/Zn) du grand Sud-Ouest français	28
A-1. DES REJETS METALLIQUES DANS UN PETIT AFFLUENT DU LOT QUI ONT DES REPERCUSSIONS DANS LE <i>CONTINUUM</i> "LOT / GARONNE / ESTUAIRE DE LA GIRONDE"	28
A-1.1. <i>A l'origine, un site industriel de traitement du zinc</i>	28
A-1.2. <i>Des stocks très importants de métaux dans les sédiments du Lot</i>	29
A-1.3. <i>La contamination des bivalves filtreurs de l'Estuaire de la Gironde</i>	30
A-2. UNE ZONE PRIVILEGIEE POUR L'ETUDE DES CONSEQUENCES ECOTOXICOLOGIQUES DE LA POLLUTION METALLIQUE	31
A-2.1. <i>Des recherches effectuées sur différents modèles biologiques dans le cadre du programme "GIS-ECOBAG"</i>	31
A-2.2. <i>Pour nos études sur les communautés de diatomées périphytiques, le choix de trois stations présentant un gradient de pollution en Cd et en Zn</i>	32
A-2.2.1. Station "polluée" (Riou-Mort)	32
A-2.2.2. Station "référence" (Boisse-Penchat)	33
A-2.2.3. Station "faiblement polluée" (Bouillac 1)	33
B- ANALYSE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES : caractérisation quantitative et qualitative de leur structure	35
B-1. METHODES D'ECHANTILLONNAGE DU PERIPHYTON	35
B-1.1. <i>Utilisation de substrats artificiels</i>	35
B-1.2. <i>Collecte sur substrats naturels</i>	36
B-2. ANALYSE QUANTITATIVE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES	37
B-3. ANALYSE QUALITATIVE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES	37

C- ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU : évaluation des facteurs influençant la structure des communautés périphytiques	39
C-1. TECHNIQUES DE DOSAGE DES METAUX (Cd/Zn)	39
C-2. ANALYSE DES NUTRIMENTS ET DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE LA COLONNE D'EAU	40
D- TRAITEMENT DES DONNEES ISSUES DE L'ANALYSE DES COMMUNAUTES ET DU MILIEU	41

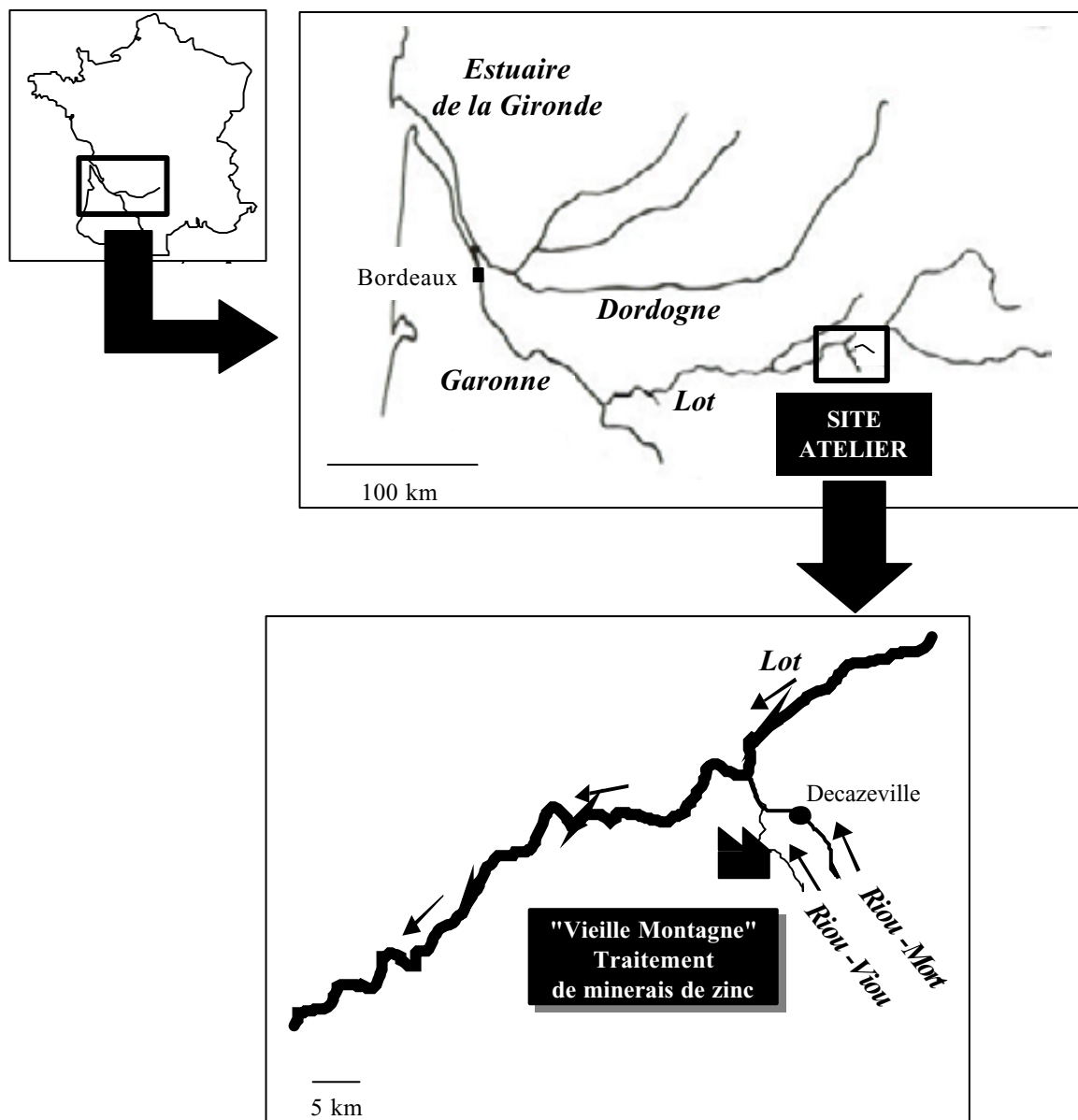


Figure 21 : Localisation du "site-atelier" sur la rivière Lot et de l'usine de traitement du zinc sur le Riou-Viou.

A- LE "SITE-ATELIER" SUR LA RIVIERE LOT :
à la source d'une des plus importantes pollutions métalliques (Cd/Zn)
du grand Sud-Ouest français

A-1. DES REJETS METALLIQUES DANS UN PETIT AFFLUENT DU LOT QUI ONT DES REPERCUSSIONS DANS LE *CONTINUUM* "LOT / GARONNE / ESTUAIRE DE LA GIRONDE"

Les études de terrain que nous avons entreprises pour évaluer les effets de la pollution métallique sur les communautés de diatomées périphtiques ont été menées sur la rivière Lot, dans le département de l'Aveyron (SO, France) (**Figure 21**). Dans cette zone, des rejets industriels de cadmium (Cd) et de zinc (Zn) dans un petit affluent du Lot (le Riou-Mort) sont à l'origine d'une pollution importante de la rivière, qui se propage dans la Garonne jusqu'à l'embouchure de l'estuaire de la Gironde, située à plus de 450 km de la zone de rejets.

A-1.1. A l'origine, un site industriel de traitement du zinc

Le site industriel de "Vieille Montagne", situé de part et d'autre du Riou-Viou, un petit affluent du Riou-Mort lui-même connecté au Lot (**Figure 21**), est à l'origine de la pollution polymétallique de cette rivière.

Installée depuis 1871, cette usine a produit du zinc pendant plus d'un siècle, à partir de minerais importés (i.e. calamine : $Zn_4[SiO_2](OH)_2 \cdot H_2O$ puis blende : ZnS). Ces minerais contiennent en moyenne 50 % de zinc, associé à du cadmium, du cuivre, du plomb, de l'argent et du soufre. Le procédé d'extraction et de purification du zinc par électrolyse a produit de grandes quantités de boues contenant des résidus métalliques, stockées sur le site et formant des "crassiers".

Pour l'ensemble de la période d'exploitation minière, les estimations indiquent que 3,4 millions de tonnes de zinc auraient été extraites, entraînant la production de plus de 10 000 tonnes de cadmium (Jozereau 1997). Bien que le traitement secondaire des boues ait permis de

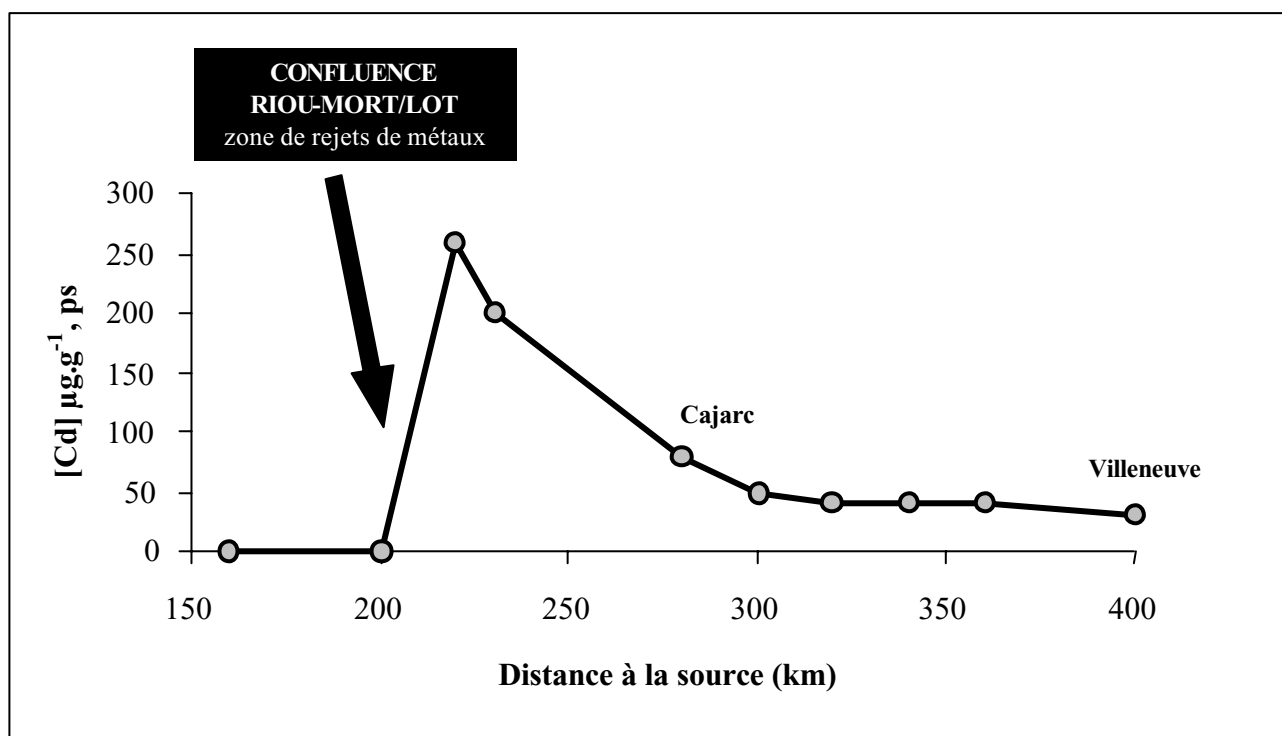


Figure 22 : Concentration en cadmium ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec) dans des bryophytes collectées sur la rivière Lot en 1987 (données Agence de l'Eau Adour-Garonne 1990).

récupérer environ 50 % du cadmium produit, des quantités très importantes de cadmium et de zinc ont été déversées dans le bassin versant du Riou-Mort depuis l'installation du site industriel, par lessivage et érosion des "crassiers". D'après les auto-contrôles réalisés par l'usine, les flux de cadmium arrivant dans le Lot par l'intermédiaire du Riou-Mort étaient estimés à 40 kg.j^{-1} avant 1986, et à 1 kg.j^{-1} entre 1986 et 1996, après des travaux d'étanchéisation des "crassiers" effectués sur le site.

Le site de "Vieille Montagne" a arrêté la production de zinc depuis 1987, et se contente aujourd'hui de façonner le zinc à partir de lingots provenant d'autres sites d'exploitation. Cependant, la percolation à travers les "crassiers" et la contamination de la nappe souterraine se poursuivent, et conduisent à des rejets relativement importants dans le Riou-Mort : des concentrations moyennes de $30 \text{ } \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et 1 mg Zn.L^{-1} ont été mesurées dans la colonne d'eau de ce ruisseau pendant la période 1995-1997 (Andrès 1997), nettement supérieures aux valeurs fixées par l'Agence de Protection de l'Environnement américaine pour la protection de la vie aquatique ($2 \text{ } \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $190 \text{ } \mu\text{g Zn.L}^{-1}$) (U.S. E.P.A. 2001), la législation française n'imposant pas de limite en milieu naturel.

A-1.2. Des stocks très importants de métaux dans les sédiments du lot

Rapidement après le mélange des eaux du Riou-Mort et du Lot, le cadmium se trouve fixé aux matières en suspension (MES, $> 0,45 \text{ } \mu\text{m}$) transportées dans la colonne d'eau. L'existence de nombreuses retenues sur la rivière Lot (barrages EDF, chaussées-écluses, barrages au fil de l'eau) favorise la sédimentation des MES et des métaux qui leur sont liés. Des quantités importantes de sédiments se sont ainsi accumulées depuis plusieurs décennies en amont de chaque retenue. Les estimations effectuées en 1992 indiquaient que 190 ± 40 tonnes de cadmium et $19\,300 \pm 3\,500$ tonnes de zinc étaient stockées dans ces réservoirs sédimentaires du Lot (Lapaquellerie *et al.* 1995), et pouvaient être partiellement remaniées, voire expulsées, lors des brusques augmentations de débit.

Les analyses effectuées à l'initiative de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne en 1987, à partir de bryophytes aquatiques retenues comme bioindicateurs de la contamination de la colonne d'eau par le cadmium, mettaient en évidence un gradient de pollution particulièrement marqué au niveau des 100 premiers kilomètres du Lot situés en aval de la zone de rejet (Agence de l'Eau Adour-Garonne 1990) (**Figure 22**).

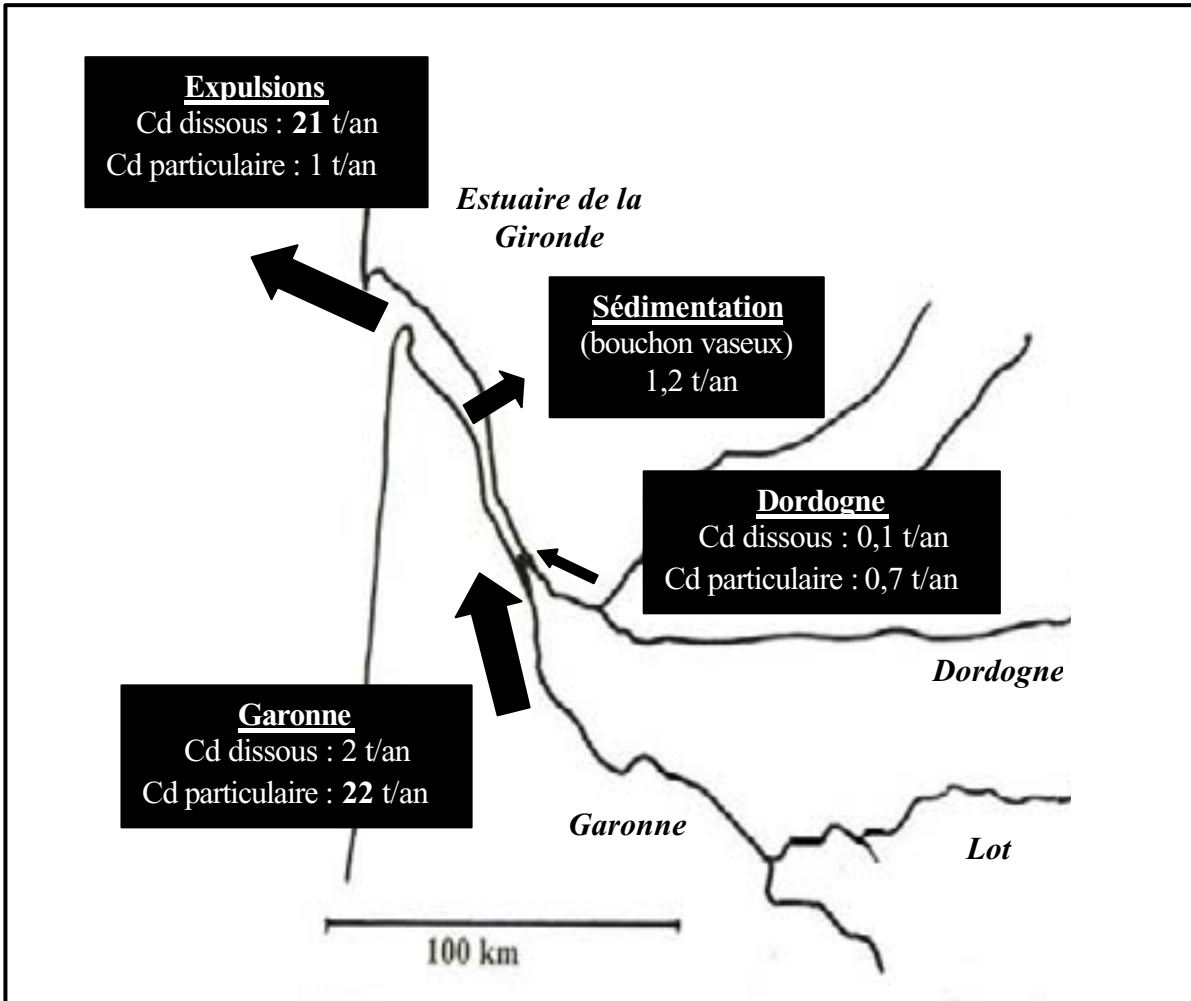
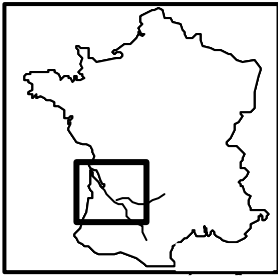


Figure 23 : Flux (tonne/an) de cadmium estimé au début des années 80
– Cd dissous et Cd particulaire –
au niveau de la Garonne et de l'estuaire de la Gironde
(données Latouche 1997).

A-1.3. La contamination des bivalves filtreurs de l'Estuaire de la Gironde

La pollution métallique de la rivière Lot se propage dans la Garonne puis dans l'estuaire de la Gironde, situé à plus de 450 km en aval. Comme le montre la **Figure 23**, le **flux annuel de cadmium** transitant à travers le *continuum* "Lot / Garonne / estuaire de la Gironde" était estimé à plus de 20 tonnes au début des années 1980 (Jouanneau *et al.* 1990, Latouche 1997). Alors que dans la Garonne, jusqu'à l'entrée de l'estuaire de la Gironde, l'essentiel du métal (91 %) est complexé avec les particules en suspension (argiles, matières organiques, etc.), la majorité du cadmium (95 %) se retrouve sous forme dissoute en aval de l'estuaire, suite aux processus géochimiques complexes qui se déroulent dans le gradient estuarien (gradient de salinité, pH, dégradation des matières organiques par les bactéries au niveau du "bouchon vaseux", etc.) (Kraepiel *et al.* 1997). La forme dissoute du cadmium étant la plus biodisponible (Moriarty 1983), elle est aisément bioaccumulée par les organismes vivant dans la zone aval de l'estuaire, en particulier par les bivalves qui filtrent d'importants volumes d'eau à des fins respiratoires et nutritionnelles, et représente de ce fait un risque écologique important.

Les analyses effectuées au début des années 80 par le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin de l'IFREMER (RNO) sur des **bivalves filtreurs** (huîtres, moules) utilisés en tant que bioindicateurs de la pollution par les métaux et par certains contaminants organiques, ont révélé des concentrations en cadmium extrêmement élevées dans le corps mou des huîtres sauvages prélevées au niveau de trois stations de l'estuaire de la Gironde (La Fosse, Pontailac et Bonne Anse) (RNO 1995) (**Figure 24**). Des valeurs maximales atteignant 100 mg Cd.kg⁻¹ (poids sec) ont été mesurées sur ces stations, alors que les niveaux moyens de contamination pour l'ensemble des autres stations étudiées sur les côtes atlantiques et méditerranéennes sont inférieurs à 2 mg Cd.kg⁻¹ (ps).

La pollution métallique a engendré des effets négatifs sur l'économie locale. La production ostréicole, le ramassage et la consommation de coquillages ont été interdits dans l'estuaire depuis le début des années 80, les concentrations en cadmium dans les bivalves étant supérieures à la norme de commercialisation française (10 mg Cd.kg⁻¹, ps). Précisons que l'impact socio-économique de la pollution métallique va s'accroître au printemps 2002, lors de la mise en application de la nouvelle directive européenne fixant à 5 mg Cd.kg⁻¹ (ps) cette norme de commercialisation. En effet, les concentrations moyennes en cadmium mesurées dans les huîtres de la baie de Marennes-Oléron (Charentes, France), située sur la côte atlantique à quelques dizaines de kilomètres au nord de l'estuaire et recevant les rejets de cadmium issus



Estuaire de la Gironde

[Cd] mg.kg⁻¹, ps
Bonne Anse : 23
Pontailiac : 41
La Fosse : 75

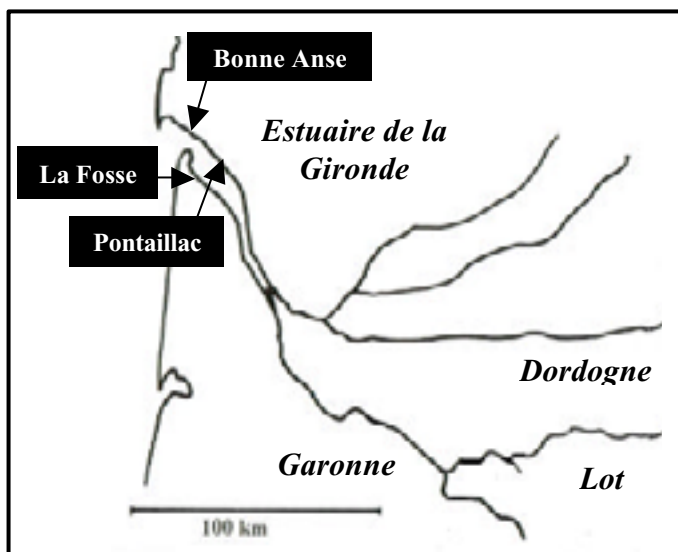
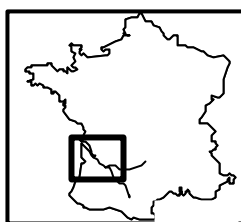


Figure 24 : Teneurs moyennes en cadmium (mg.kg⁻¹, poids sec) mesurées entre 1979 et 1993 dans les huîtres et les moules collectées au niveau de l'ensemble des stations côtières de France (données RNO 1995).

du panache de la Gironde, sont inférieures à la norme actuellement en vigueur, mais supérieures à la future réglementation (entre 7 et 8 mg Cd.kg⁻¹ ps) (Boutier *et al.* 2000).

A-2. UNE ZONE PRIVILEGIEE POUR L'ETUDE DES CONSEQUENCES ECOTOXICOLOGIQUES DE LA POLLUTION METALLIQUE

A-2.1. Des recherches effectuées sur différents modèles biologiques dans le cadre du programme "GIS-ECOBAG"

Dans le but d'analyser les processus géochimiques et écotoxicologiques liés à la contamination polymétallique du *continuum* "Lot / Garonne / estuaire de la Gironde", un programme de recherche intitulé "Impacts des contaminants métalliques" a été développé en 1994-95 au sein du Groupement d'Intérêt Scientifique "Environnement, Ecologie et Economie des Bassins de l'Adour et de la Garonne" (GIS-ECOBAG), dont l'objectif principal est d'étudier les ressources en eau et leur gestion à l'échelle du bassin Adour-Garonne.

Ce programme pluridisciplinaire repose sur une étroite collaboration entre deux laboratoires de l'Université Bordeaux 1, appartenant à l'UMR CNRS EPOC¹ 5805 (Directeur : P. Buat-Ménard / Ph. Bertrand) : l'équipe de Géochimie du DGO² (Directeur : J.-P. Peypouquet) et le LEESA (Directeur : A. Boudou). Les travaux de terrain ont été menés avec la participation d'autres équipes, notamment l'Unité de Recherche Qualité des Eaux du Département Gestion des milieux aquatiques du Cemagref (Bordeaux/Cestas), le CESAC³ (Université Toulouse III / CNRS), et le Laboratoire de Radioécologie Continentale de l'IPSN⁴ de Cadarache. Les recherches ont été financées par la Région Aquitaine, les fonds européens Feder⁵, le Ministère de l'Environnement, l'Agence de l'Eau Adour-Garonne et, en tant que soutien de base, par l'Université Bordeaux 1 et le CNRS.

Les travaux menés par le LEESA sont orientés vers l'analyse des transferts des métaux entre les biotopes aquatiques - colonne d'eau et sédiments - et la composante biologique des hydrosystèmes, et ont déjà conduit à la réalisation de trois thèses de Doctorat (Andrès 1997,

¹ UMR EPOC : Unité Mixte de Recherche "Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Côtiers".

² DGO : Département de Géologie et d'Océanographie.

³ CESAC : Centre d'Ecologie des Systèmes Aquatiques Continentaux.

⁴ IPSN : Institut de Protection de la Sûreté Nationale.

⁵ Feder : Fond Européen d'aide au Développement et à l'Équipement Régional.

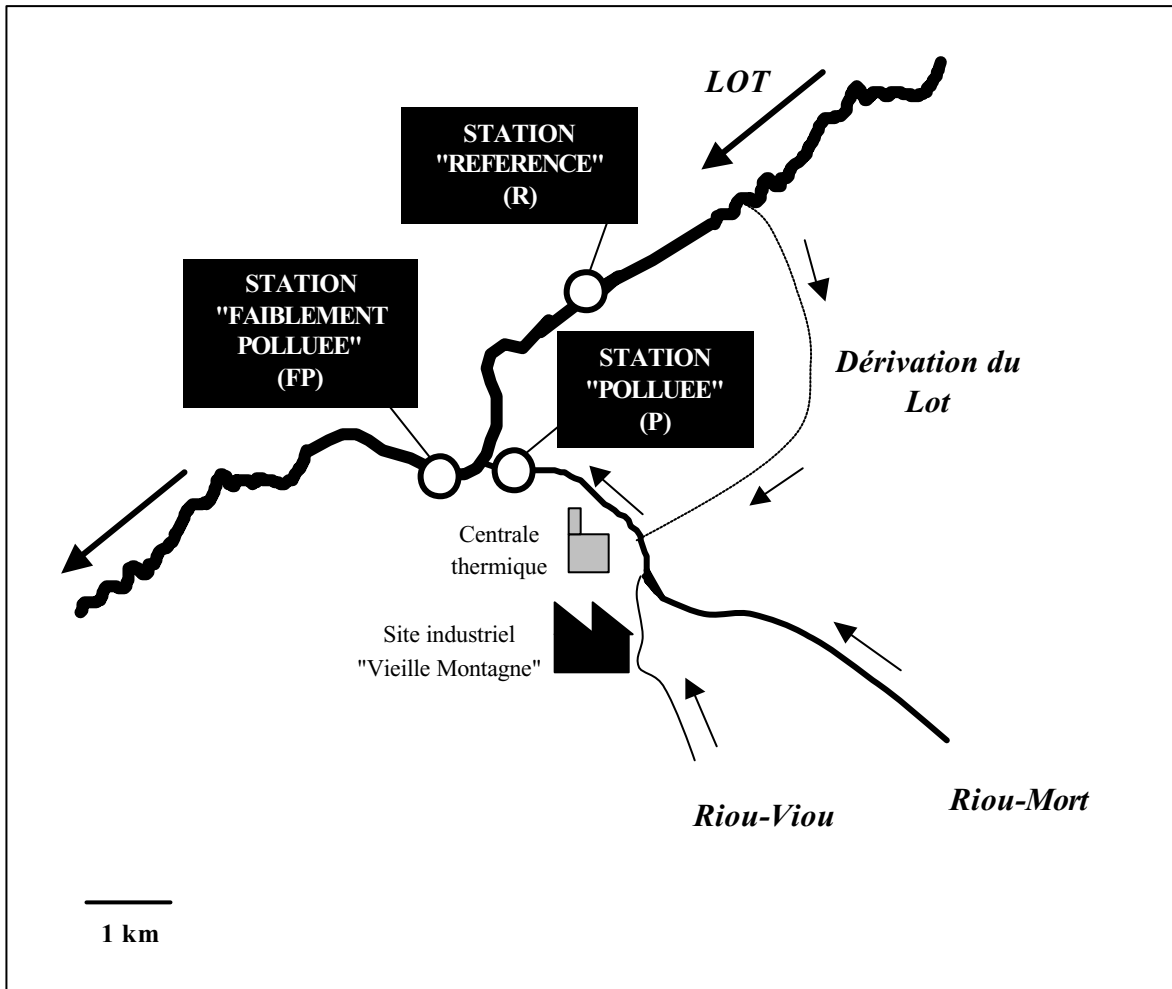


Figure 25 : Localisation des stations d'étude sur la rivière Lot et le Riou-Mort.

Baudrimont 1997, Simon 2000). Différents modèles biologiques ont ainsi fait l'objet d'études ciblées (poissons, bivalves, écrevisses).

Nos travaux sur les communautés de diatomées périphytiques permettent de prendre en compte la composante végétale de ces écosystèmes, située à la base des réseaux trophiques. Rappelons qu'aucune étude concernant les communautés périphytiques n'a été effectuée le long de ce gradient de pollution métallique depuis 1978 (Say 1978).

A-2.2. Pour nos études sur les communautés de diatomées périphytiques, le choix de trois stations présentant un gradient de pollution en Cd et en Zn

Nos expériences de terrain ont été menées sur trois stations d'étude, choisies de manière à présenter un gradient de pollution bien marqué par rapport aux concentrations en cadmium et en zinc dans la colonne d'eau, en se basant sur les nombreuses analyses effectuées lors d'études antérieures par le LEESA et le DGO de l'Université Bordeaux 1.

A-2.2.1. Station "polluée" (Riou-Mort)

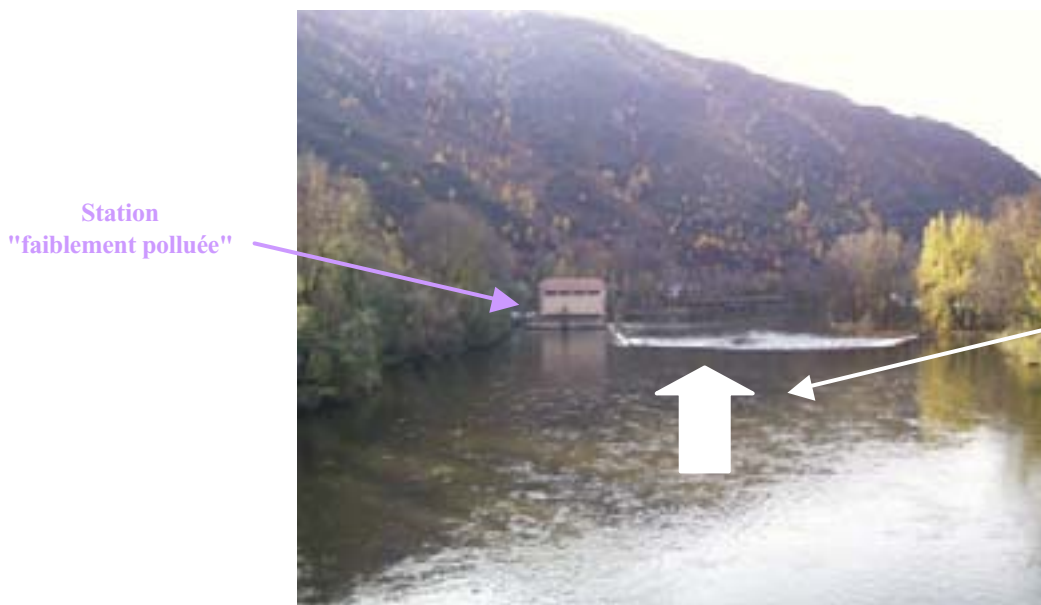
Le Riou-Viou, sur lequel est implanté le site industriel de "Vieille Montagne", à l'origine de la pollution métallique, était inaccessible pour nos expérimentations (territoire de l'usine). La station "polluée" (P) a donc été choisie sur le Riou-Mort, quelques dizaines de mètres en amont de sa confluence avec le Lot (**Figures 25 et 26**). La station se situant en aval de la confluence avec le Riou-Viou et des rejets de l'usine, les concentrations en métaux dans la colonne d'eau sont relativement importantes. Des valeurs moyennes proches de $30 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et 1 mg Zn.L^{-1} ont été mesurées pendant la période 1995- 1997 (Andrès 1997).

Au niveau de cette station, la largeur du cours d'eau n'est que de 6 m environ, et son débit annuel moyen de $3 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$. Le fond du ruisseau est constitué de sable et de gravier. En plus de la pollution métallique, le Riou-Mort présente un niveau assez important de pollution organique, avec des valeurs de demande biologique en oxygène (DBO_5) atteignant 9 mg.L^{-1} d' O_2 à certaines périodes de l'année (données Agence de l'Eau Adour Garonne 1998-99). Dans la grille d'évaluation des Agences de l'Eau, ce niveau de pollution organique correspond à la classe "passable" ($5 < \text{DBO}_5 < 10 \text{ mg.L}^{-1}$). Ajoutons qu'une centrale thermique, placée le long du Riou-Mort en amont de notre station d'étude, utilise pour son refroidissement de l'eau en



Rivière Lot

Riou-Mort



Station
"faiblement polluée"

Rivière Lot

Figure 26 : Photographies du "site-atelier" sur la rivière Lot et le Riou-Mort.

provenance d'une dérivation du Lot, qu'elle rejette ensuite dans le Riou-Mort (**Figure 25**). L'activité discontinue de cette usine engendre un réchauffement intermittent des eaux du Riou-Mort, qui peut atteindre plus de 7°C en hiver.

A-2.2.2. Station "référence" (Boisse-Penchat)

La partie du Riou-Mort située en amont de la confluence avec le Riou-Viou et des rejets métalliques étant inadaptée pour nos expérimentations (largeur, profondeur et débit très faibles), la station Boisse-Penchat a été choisie comme "référence" (R). Cette station, située sur la rive gauche du Lot, 4 km environ en amont de sa confluence avec le Riou-Mort et des rejets métalliques (**Figures 25 et 26**), présentait pendant la période 1995-1997 des concentrations moyennes de 0,04 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et 7 $\mu\text{g Zn.L}^{-1}$ dans la colonne d'eau, proches des bruits de fond "géochimiques" dans cette zone du Sud-Ouest du Massif Central (Andrès 1997). Au niveau de cette station, la largeur de la rivière Lot est environ de 70 m et le débit annuel moyen de 85 $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$. Le niveau de pollution organique est assez faible. En effet, les valeurs de demande biologique en oxygène (DBO_5) ne dépassent pas 2 mg.L^{-1} d' O_2 (données Agence de l'Eau Adour Garonne 1998-99), ce qui correspond à la classe "excellente" dans la grille d'évaluation de la qualité du milieu des Agences de l'Eau ($\text{DBO}_5 < 3 \text{ mg.L}^{-1}$).

A-2.2.3. Station "faiblement polluée" (Bouillac 1)

Une station "faiblement polluée" (FP) ("slightly polluted" - SP - dans les articles en anglais), présentant des concentrations en métaux dans la colonne d'eau intermédiaires entre celles de la station "référence" et de la station "polluée", a été choisie sur la rive gauche du Lot, à 300 m environ en aval de sa confluence avec le Riou-Mort (**Figures 25 et 26**). A ce niveau, le mélange des eaux du Lot et du Riou-Mort conduit à la dilution des apports métalliques venant du Riou-Mort. Les concentrations moyennes en métaux dans la colonne d'eau de cette station appelée Bouillac 1 étaient proches de 1 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et 0,06 mg Zn.L^{-1} pendant la période 1995-1997 (Andrès 1997).

Les trois stations d'étude retenues présentent donc un **gradient de pollution métallique** par rapport aux concentrations en Cd et en Zn dans la colonne d'eau, d'après les mesures effectuées pendant la période 1995-97 (Andrès 1997). Les caractéristiques hydrodynamiques et physico-chimiques des stations "référence" et "faiblement polluée", localisées à quelques kilomètres sur la rivière Lot, sont comparables. Celles de la station "polluée", située sur le Riou-Mort qui présente des débits plus faibles et irréguliers et un plus fort niveau de pollution organique, sont différentes. Cependant, la dilution fréquente des eaux du Riou-Mort par des eaux du Lot, via la centrale thermique, entraîne l'introduction de masses d'eau chargées en micro-organismes du Lot au niveau de la station "polluée", et rend plus homogènes les communautés périphtiques rencontrées sur les trois stations.



Substrat artificiel en verre
recouvert de périphyton

Lame de cutter



Récipient en polypropylène
contenant l'échantillon de périphyton
en solution dans de l'eau

Figure 27 : Photographies illustrant la méthodologie de récupération du périphyton à la surface des substrats artificiels en verre utilisés sur le terrain.

B- ANALYSE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES

PERIPHYTIQUES : caractérisation quantitative

et qualitative de leur structure

Les différentes expériences réalisées sur le terrain et en laboratoire pour évaluer les effets de la pollution métallique au niveau des communautés de diatomées périphytiques ont reposé sur des critères d'analyse identiques, au niveau quantitatif (densité totale des diatomées) et qualitatif (composition spécifique, richesse spécifique et diversité des communautés).

Toutes les expériences ont été menées en **conditions automnales**. Cette saison apparaît comme favorable au développement des diatomées, qui sont généralement dominantes au sein du périphyton des rivières à cette période de l'année, alors que les algues vertes sont moins représentées (Whitton 1980, McIntire *et al.* 1996) (**Figure 2**).

Les paragraphes suivants présentent les méthodes d'échantillonnage du périphyton au niveau de substrats artificiels et naturels, et les méthodes d'analyse quantitative et qualitative des communautés de diatomées.

B-1. METHODES D'ECHANTILLONNAGE DU PERIPHYTON

B-1.1. Utilisation de substrats artificiels

Au cours des différentes expériences, le périphyton a été échantillonné sur des substrats artificiels en verre, introduits dans la colonne d'eau des canaux artificiels de terrain ou de laboratoire, ou directement dans le cours d'eau au niveau des stations de terrain.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'utilisation de substrats artificiels présente de nombreux avantages par rapport à l'échantillonnage sur substrats naturels. En effet, ils permettent de collecter des communautés représentatives du passé récent du milieu, et d'homogénéiser la nature des substrats entre les différentes stations étudiées ; ils permettent également de réaliser une approche comparative quantitative, puisque toutes les communautés échantillonnées ont connu une période de colonisation identique sur des substrats de surface identique. Les substrats en verre sont couramment utilisés, aussi bien en milieu naturel (Weber

and McFarland 1981, Roch *et al.* 1985, Kaufman 1982, Ivorra *et al.* 1999) qu'en laboratoire (Péres 1996, Péres *et al.* 1995, 1997, Ivorra *et al.* 2000 a). Le choix des substrats en verre présente donc l'avantage de permettre la comparaison de nos résultats avec ceux de nombreuses autres études. Il permet également d'échantillonner le périphyton sur une surface facile à racler, constante et inerte, réduisant la variabilité entre les échantillons (Meir *et al.* 1983).

Nous avons adapté la dimension des substrats artificiels aux protocoles choisis et à la taille des systèmes expérimentaux : des lames de verre (30 x 6 cm) pour le terrain, et des lames type "lame de microscope" (7,6 x 2,6 cm) pour les canaux de laboratoire.

A chaque temps d'échantillonnage du périphyton (avec une périodicité de 1 ou 2 semaines de colonisation, suivant les protocoles), des substrats artificiels ont été prélevés au niveau de chaque système expérimental. Immédiatement après leur prélèvement, les substrats ont été raclés à l'aide d'une lame de cutter ou de rasoir, rincés avec de l'eau, et les biofilms périphytiques récupérés à leur surface ont été rassemblés en un seul échantillon, dans un récipient en polypropylène (**Figure 27**). Les **analyses quantitatives et qualitatives** des communautés de diatomées ont été effectuées à partir de cet échantillon, conservé dans un volume déterminé de solution d'eau formolée à 5 % (Formol 37 %, Prolabo).

B-1.2. Collecte sur substrats naturels

Au cours des premières études de terrain, parallèlement à l'utilisation de substrats artificiels, des communautés de diatomées périphytiques ont été échantillonnées directement sur des substrats naturels (cailloux ou galets) prélevés dans le cours d'eau au niveau de chaque station d'étude, en suivant les mêmes procédures d'échantillonnage que pour les substrats artificiels.

L'échantillonnage de substrats naturels ne permet pas de réaliser d'analyse comparative quantitative des communautés de diatomées (récupération incomplète, surface et temps de colonisation difficile à estimer), mais l'**analyse qualitative** permettra de comparer la composition taxinomique des communautés naturelles avec celle des communautés développées sur les substrats artificiels.

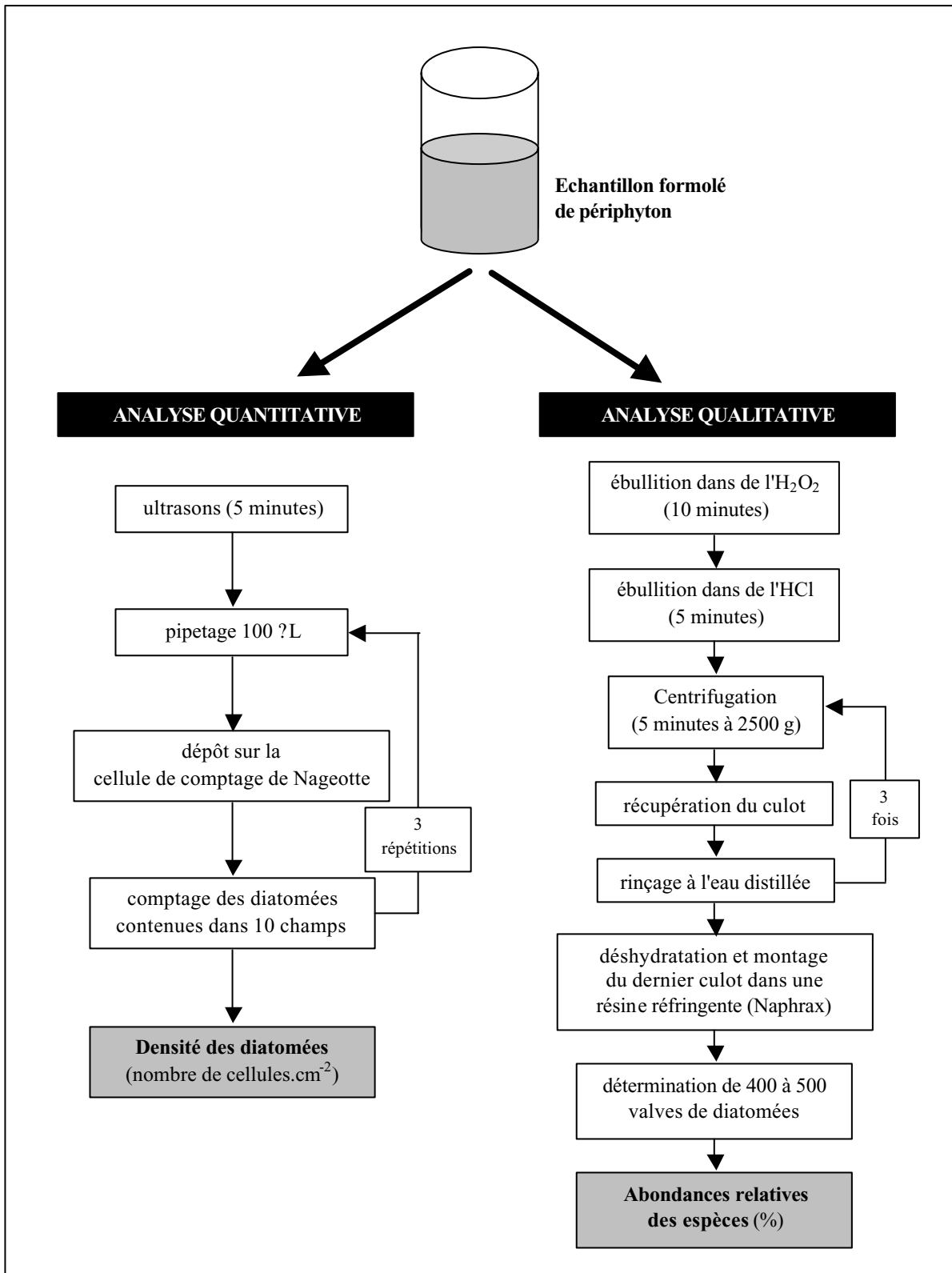


Figure 28 : Protocoles des analyses quantitative et qualitative des communautés de diatomées périphytiques.

B-2. ANALYSE QUANTITATIVE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES

La **densité totale des diatomées** développées sur les substrats artificiels a été estimée à partir des échantillons de périphyton formolés, en microscopie photonique, au grossissement x 200 (microscope Olympus BH-2 ou photomicroscope Leica DMRB).

L'énumération des algues a été réalisée au moyen d'une cellule de comptage de type cellule de Nageotte, divisée en 40 champs rectangulaires de 0,5 mm de profondeur et de 1,25 μL de volume chacun.

Après homogénéisation aux ultrasons des échantillons de périphyton (5 minutes ou plus selon la densité de l'échantillon), une partie aliquote (100 μL) a été déposée sur la cellule de Nageotte, et les diatomées contenues dans 10 champs répartis sur toute la largeur de la cellule ont été dénombrées. Pour chaque échantillon de périphyton, 3 prélèvements aliquotes successifs ont été réalisés, et le dénombrement des cellules a donc été effectué dans 30 champs au total. Le protocole d'analyse quantitative est détaillé dans la **Figure 28**.

La densité des diatomées sur les substrats, en nombre de cellules par cm^2 , a été estimée par la formule :

$$[A / (30 \times 1,25) \times V] / S$$

A = nombre total de cellules dénombrées dans l'ensemble des 30 champs

30 = nombre total de champs comptés

1,25 = volume d'un champ (μL)

V = volume initial de l'échantillon formolé de périphyton (μL)

S = surface totale des lames de verre raclées pour former l'échantillon de périphyton (cm^2)

B-3. ANALYSE QUALITATIVE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES

L'identification des diatomées présentes dans les échantillons de périphyton a été réalisée à partir de l'examen microscopique de leur squelette siliceux, après un **traitement chimique** permettant de débarrasser les cellules de leur protoplasme et de leur revêtement organique externe, selon le protocole suivant (**Figure 28**) :

- après au moins 24 heures de sédimentation des diatomées dans les échantillons formolés de périphyton et élimination de la fraction surnageante, le culot a été traité à l'eau

oxygénée bouillante pendant 10 minutes pour dégrader la matière organique (H₂O₂ 30 %, Prolabo) ;

- une deuxième étape de digestion par de l'acide chlorhydrique bouillant, pendant 5 minutes, a souvent été nécessaire pour obtenir un nettoyage satisfaisant des frustules (HCl 35 %, Prolabo) ;

- les échantillons ont ensuite été soumis à une succession d'au moins trois centrifugations (5 min à 2500 g), suivies chacune de la remise en suspension des culots dans de l'eau distillée, pour éliminer toute trace d'eau oxygénée et d'acide qui nuirait à leur observation ;

- une partie aliquote de l'échantillon nettoyé a été déposée sur une lamelle, déshydratée par séchage et montée dans une résine réfringente, le Naphrax (Northern Biological Supplies Ltd, Angleterre - Indice de réfraction = 1,74), conduisant à la fabrication d'une lame permanente.

L'identification des diatomées a été réalisée à partir des lames permanentes, en microscopie photonique au grossissement x 1000 (photomicroscope Leica DMRB, Wetzlar, Allemagne). L'effort de détermination a porté sur 400 à 500 valves de diatomées, identifiées dans chaque échantillon au niveau spécifique ou infra-spécifique, sachant qu'au-delà de 500 individus le nombre d'espèces inventoriées n'augmente plus de façon significative (Coste 1978). L'identification a fait appel aux ouvrages les plus récents de la Süßwasserflora (Krammer and Lange-Bertalot 1986, 1988, 1991 a, 1991 b), et à la flore réalisée par Michel Coste pour la mise en place de l'Indice Biologique Diatomées, illustrée par des microphotographies (Coste 1998, Prygiel and Coste 2000).

Les inventaires de diatomées ont été saisis sur informatique à l'aide du logiciel "OMNIDIA" (Lecoinge *et al.* 1993), qui fournit des tableaux d'inventaires en abondance relative (%) de chaque espèce.

Deux indices ont été calculés à partir des résultats des inventaires : la **richesse spécifique** (S), qui désigne le nombre total d'espèces inventoriées dans chaque échantillon, et l'indice de **diversité** de Shannon-Weaver (H') (Shannon and Weaver 1948). Cet indice prend en compte à la fois le nombre d'espèces présentes et les abondances relatives des diverses espèces. Il a été calculé avec la formule suivante :

$$H' = - \sum (p_i \log_2 p_i)$$

avec p_i = abondance relative de l'espèce i et $\log_2 p_i = \log p_i / \ln 2$

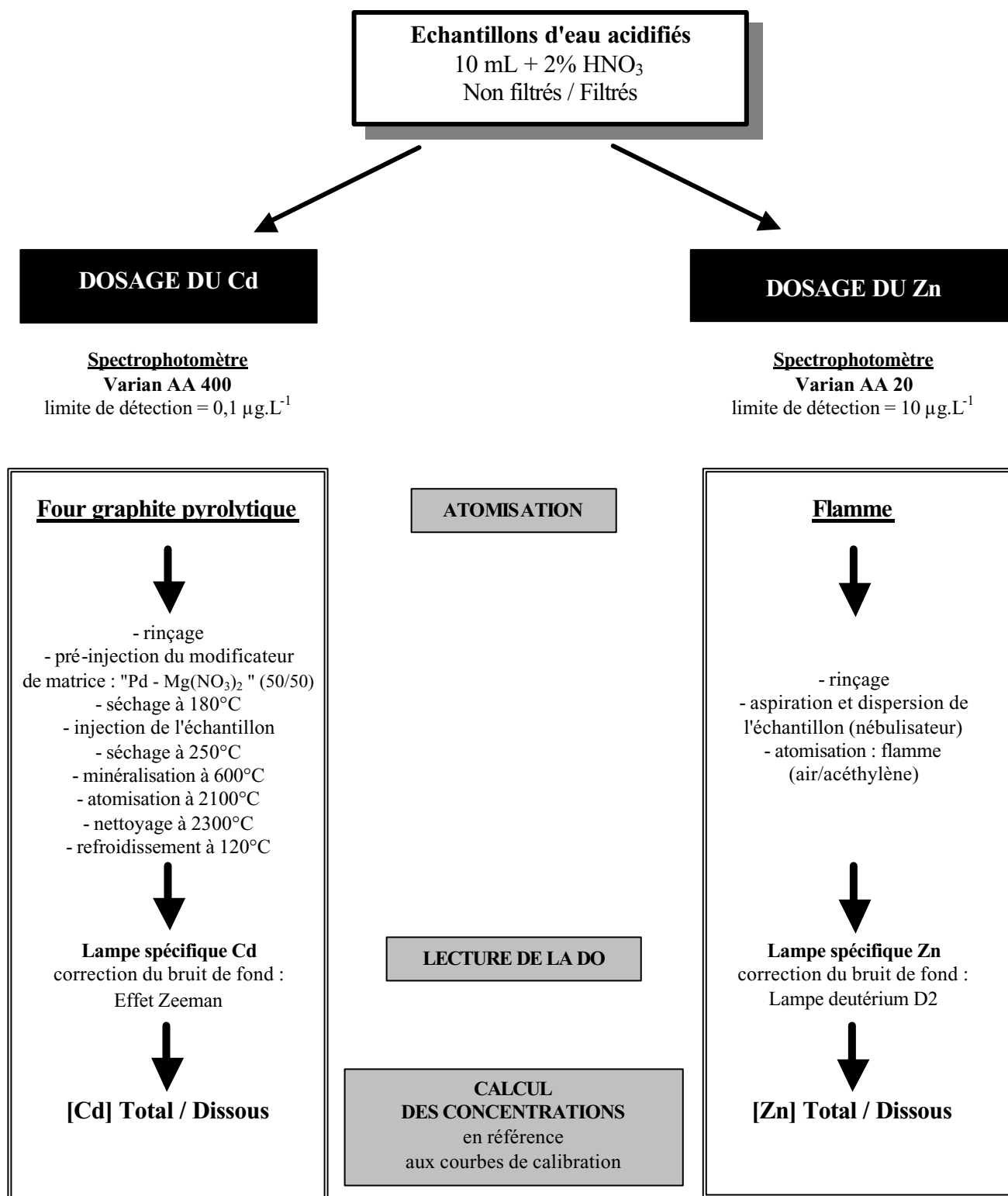


Figure 29 : Principales étapes du dosage du cadmium et du zinc dans les échantillons d'eau, par spectrophotométrie d'absorption atomique.

C- ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU :
évaluation des facteurs influençant
la structure des communautés périphtiques

Les expériences que nous avons menées sur le terrain et en laboratoire ont nécessité la réalisation d'analyses physico-chimiques, pour déterminer les concentrations en métaux dans la colonne d'eau, ainsi que les concentrations en nutriments, essentiels à la croissance algale, et les valeurs des paramètres environnementaux classiquement pris en compte, comme la température, l'intensité lumineuse, le pH, la concentration en oxygène dissous, etc.

C-1. TECHNIQUES DE DOSAGE DES METAUX (Cd/Zn)

Les dosages des concentrations en cadmium (Cd) et en zinc (Zn) ont été effectués sur des échantillons d'eau prélevés dans les systèmes expérimentaux ou dans les cours d'eau, suivant les recommandations des méthodes "propres" ("clean techniques"), et recueillis dans des flacons en polypropylène. Pour chaque prélèvement, un échantillon d'eau a été recueilli directement pour doser la concentration "totale" en métaux, et un autre a été filtré (filtres en polycarbonate Cyclopore de 0,45 µm, Autotop WF, Polylabo) pour évaluer la fraction "dissoute" des métaux. Dans les deux cas, les échantillons ont été acidifiés à 2 % (HNO₃ pur, Merck), pour éviter la complexation du métal sur les parois du flacon, et maintenus à basse température (4-5°C), pour éviter les dégradations bactériennes.

Le cadmium a été dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique (Varian AA 400 à correction Zeeman, Victoria, Australie), après atomisation électrothermique en four graphite pyrolytique (modèle GTA96, Varian). Afin de réduire l'effet de la matrice biologique, un "modificateur" constitué d'un mélange "Palladium - Mg(NO₃)₂ (50/50)" a été ajouté à l'échantillon. La limite de détection est de 0,1 µg Cd.L⁻¹ (**Figure 29**).

L'analyse du zinc a été effectuée selon la technique d'atomisation en flamme (Varian AA20, correction deutérium : lampe D2). L'atomisation du métal est permise par la combustion du mélange "air/acétylène". La limite de détection est de 10 µg Zn.L⁻¹ (**Figure 29**).

La validité des mesures a été contrôlée systématiquement par le passage, dans chaque série de dosages, d'échantillons certifiés TORT-2 (Lobster hepatopancreas tissue - 26,7 µg Cd.g⁻¹ et 180 µg Zn.g⁻¹ - Certified Reference Materials for Trace Metals, National Research Council, Ottawa, Canada).

C-2. ANALYSE DES NUTRIMENTS ET DES PRINCIPAUX PARAMETRES DE LA COLONNE D'EAU

Lors des premières expériences de terrain¹, les dosages des concentrations en nutriments, effectués par le Laboratoire de Radioécologie Continentale de l'IPSN² de Cadarache, ont été réalisés par chromatographie liquide pour les phosphates, les sulfates et les nitrates.

Au cours des autres expériences, *in situ* ou en laboratoire, les dosages des nutriments ont été effectués par le Cemagref de Cestas, selon les méthodes colorimétriques standardisées : normes AFNOR n° NF EN 1189 pour les phosphates, NF T 90007 pour la silice, NF EN ISO 11732 pour l'ammonium et NF EN ISO 13395 pour les nitrates (AFNOR 2001).

Les paramètres environnementaux de la colonne d'eau classiquement pris en compte (température, pH, conductivité et concentration en oxygène dissous) ont été évalués à l'aide d'une mallette multi-paramètre (WTW, Weilheim, Allemagne). La turbidité a été mesurée avec un turbidimètre HANNA (Woonsocket, RI, USA), et l'intensité lumineuse instantanée (radiations photosynthétiquement actives, 400-700 nm) avec un photomètre LI-COR (Lincoln, NE, USA). Le contrôle de la vitesse du courant dans les canaux de terrain et de laboratoire a été assurée par la régulation du débit au sein de ces canaux. Lors des études de terrain en conditions non contrôlées³, la vitesse du courant de surface des cours d'eau a été estimée au niveau de chaque station d'étude, au moyen d'un flotteur et d'un chronomètre.

¹ cf. Partie III.

² IPSN : Institut de Protection de la Sécurité Nationale.

³ cf. Partie IV.

D- TRAITEMENT DES DONNEES ISSUES DE L'ANALYSE DES COMMUNAUTES ET DU MILIEU

Les résultats de nos expériences regroupent deux types de données : celles caractérisant les communautés de diatomées périphtiques (densité des diatomées, abondances relatives des espèces, richesse spécifique et diversité), et celles caractérisant les conditions physico-chimiques du milieu (concentrations en métaux, en nutriments, en oxygène dissous, température, pH, conductivité, etc.).

Pour l'ensemble des données, un **traitement statistique descriptif** a été entrepris, afin de calculer les moyennes et les écarts-types des variables considérées. La majorité des graphiques présente les valeurs moyennes des variables, sous forme d'histogrammes accompagnés d'une droite verticale figurant l'écart-type.

Pour les données relatives à l'étude des communautés de diatomées, deux autres types d'analyse statistique ont été effectués : (i) des **analyses de variance** à 1 ou 2 facteurs (ANOVA), pour étudier les effets des facteurs pris en compte (niveau de contamination métallique, durée de colonisation des substrats) sur l'ensemble des critères quantitatifs et qualitatifs sélectionnés (densité des diatomées, abondances relatives des espèces, richesse spécifique et diversité des communautés) ; (ii) des **analyses en composantes principales** (ACP), à partir des données concernant les abondances relatives des espèces, afin de comparer la composition spécifique des communautés de diatomées collectées au cours de chaque expérience.

Les **analyses de variance** à 1 ou 2 facteurs (ANOVA) ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA (Version 5, Edition 97, Statsoft France), après vérification des hypothèses de base (normalité de la distribution et homogénéité du terme d'erreur), graphiquement ou à l'aide de tests post-hoc. Lorsque les hypothèses n'étaient pas vérifiées, nous avons utilisé une transformation des données de type BOX-COX, qui permet de résoudre au mieux les problèmes de non-normalité et d'hétérogénéité de l'erreur. Le paramètre BOX-COX a été estimé grâce à la méthode du "Maximum Likelihood Estimator" (MLE). Le risque de première espèce alpha choisi *a priori* a été fixé à 5 %. Dans le cas de rejet de l'hypothèse nulle de l'ANOVA, un test de la plus petite différence significative (PPDS ou Least Square Deviation, LSD) a été réalisé pour détecter les différences significatives entre les groupes.

Les **analyses en composantes principales** (ACP) ont été effectuées à l'aide du logiciel SPAD (version 4). L'ACP est une méthode factorielle, qui permet de réduire la dimension des

données en construisant de nouvelles variables synthétiques (combinaisons linéaires des anciennes variables) (Joliffe 1986). Les ACP ont été réalisées à partir des abondances relatives d'une partie des espèces présentes au sein des communautés (les 55 espèces présentant les plus grandes valeurs après cumul de leurs abondances relatives respectives dans toutes les communautés). Les résultats obtenus sont présentés sous forme de **deux graphiques**. Le premier illustre la projection, dans le plan principal défini par les composantes 1 et 2, des "individus" au sens statistique du terme (communautés de diatomées). Le deuxième graphique illustre la projection des "variables", au sens statistique du terme (abondances relatives des espèces), sur le cercle de corrélation défini par ces deux composantes. Les graphiques prennent donc uniquement en compte la projection des "individus" et des "variables" dans le plan défini par les composantes 1 et 2. Cette représentation permet en effet de restituer la majeure partie de l'information, l'observation du poids relatif des différentes composantes ayant toujours mis en évidence une grande différence d'ordre de grandeur entre les composantes 1 et 2 et les composantes suivantes. Précisons que par souci de clarté, seules les "variables" présentant des coordonnées supérieures à un certain seuil sur la composante 1 ou sur la composante 2 ont été représentées sur le graphique (le seuil a été fixé à 0,55 ou 0,6 suivant le nombre de "variables" ainsi sélectionnées). Ces "variables" peuvent être considérées comme les plus discriminantes, et ont été utilisées pour interpréter les séparations entre "individus" révélées par le premier graphique.

PARTIE III

**ETUDES *IN SITU* EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES
DES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE
SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES
DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES**

SOMMAIRE DE LA PARTIE III

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	46
A-1. DESCRIPTION DES CANAUX EXPERIMENTAUX DE TERRAIN	47
A-2. DESCRIPTION DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	48
B- COMPARAISON DE LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES "RESIDENTES" DEVELOPPEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION : évaluation en conditions semi-contrôlées des effets de la pollution métallique sur des communautés exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement ¹	50
C- ANALYSE DE COMMUNAUTES NATURELLES LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION ET COMPARAISON AVEC LES COMMUNAUTES "RESIDENTES" DEVELOPPEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX : évaluation de la représentativité de nos systèmes expérimentaux par rapport au milieu naturel	64
C-1. RESULTATS	65
C-1.1. Analyse qualitative globale des communautés de diatomées	65
C-1.2. Composition spécifique des communautés de diatomées	65
C-2. DISCUSSION	66
C-2.1. Au niveau de chaque station d'étude, une grande similarité entre les communautés développées dans les canaux artificiels et les communautés naturelles, démontrant le bon niveau de représentativité de nos systèmes expérimentaux par rapport au milieu naturel	66
C-2.2. Le long du gradient de pollution, la mise en évidence de différences structurales comparables avec les deux types de communautés, démontrant le rôle mineur du courant au niveau des communautés naturelles	67

¹ Article soumis à *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* en décembre 2001.

D- EVOLUTION STRUCTURALE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX "TRANSFERES" ENTRE DIFFERENTS POINTS DU GRADIENT DE POLLUTION : évaluation en conditions semi-contrôlées des effets de la pollution métallique sur des communautés exposées aux métaux à un stade plus avancé de développement	69
D-1. RESULTATS	70
<i>D-1.1. Analyse quantitative et qualitative globale des communautés de diatomées</i>	<i>70</i>
<i>D-1.2. Composition spécifique des communautés de diatomées</i>	<i>71</i>
D-2. DISCUSSION	73
<i>D-2.1. Des communautés "transférées" à un stade encore précoce de leur développement</i>	<i>73</i>
<i>D-2.2. Sur la station "polluée", une évolution rapide de la structure des communautés "transférées" vers celle des communautés "résidentes"</i>	<i>73</i>
<i>D-2.3. Sur la station "faiblement polluée", une croissance plus importante des communautés "résidentes" par rapport aux communautés "transférées", qui pourrait être liée à des mécanismes d'adaptation à long-terme</i>	<i>74</i>
E- CONCLUSION	76
E-1. CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	76
E-2. HYPOTHESES CONCERNANT LES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES	77
<i>E-2.1. Une réduction marquée de l'architecture en trois dimensions des communautés "résidentes", exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement.....</i>	<i>77</i>
<i>E-2.2. Des perturbations importantes de l'évolution des communautés "transférées", exposées aux métaux à un stade de développement précoce</i>	<i>78</i>
E-3. DEFINITION DES RECHERCHES SUIVANTES	79

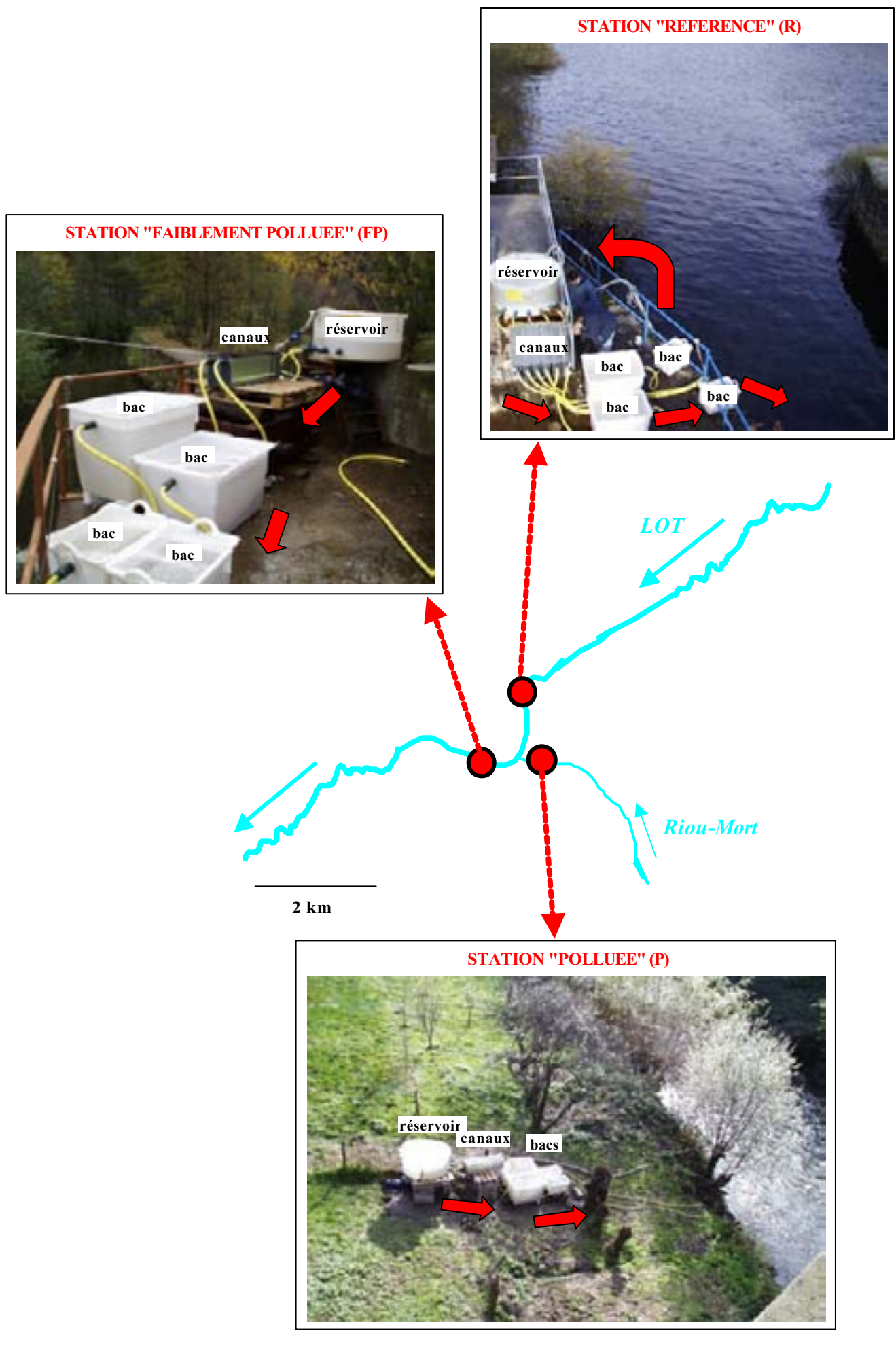


Figure 30 : Photographies des systèmes expérimentaux mis en place sur les trois stations d'étude.

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE

Une méthodologie originale a été développée afin de pouvoir comparer les communautés de diatomées périphytiques se développant le long d'un gradient de contamination métallique en milieu naturel, en limitant entre les stations d'étude les variations des facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la structure de ces communautés et de masquer les effets des métaux.

Des systèmes expérimentaux ont été mis en place sur la berge de la rivière Lot et du Riou-Mort, en automne 1998, au niveau des stations d'étude décrites précédemment¹ : station "référence" (R), station "faiblement polluée" (FP) et station "polluée" (P), qui présentent un gradient de pollution en cadmium (Cd) et en zinc (Zn) dans la colonne d'eau. Au niveau de chaque station, une pompe immergée dans le cours d'eau a assuré l'alimentation en eau de **canaux expérimentaux** placés sur la berge, par l'intermédiaire d'un réservoir (**Figure 30**). Les canaux, contenant des substrats artificiels, ont permis le développement des communautés de diatomées périphytiques dans des **conditions semi-contrôlées** (vitesse du courant, nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats et conditions lumineuses homogénéisées entre les stations d'étude). Une série de bacs a été connectée à leur sortie, servant à la réalisation d'autres études écotoxicologiques (évaluation de la bioaccumulation de métaux par des poissons, des bivalves, des macrophytes et des écrevisses, Simon 2000).

Deux études ont été menées en parallèle, afin d'évaluer les effets de la pollution métallique à **différents stades du développement des communautés** périphytiques.

Dans une **première étude**, nous avons suivi le développement des communautés sur des substrats artificiels vierges, dans des canaux expérimentaux placés sur les trois stations d'étude. Ce protocole a permis d'évaluer les effets de la pollution sur des communautés exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement. Les résultats obtenus dans les canaux ont été comparés à ceux issus de l'analyse de communautés naturelles, prélevées sur des substrats du lit des cours d'eau, afin d'évaluer la représentativité de nos systèmes expérimentaux par rapport au milieu naturel. Précisons que cette première étude en canaux permet de révéler les effets à long-terme de la pollution, sur les souches de diatomées

¹ Partie II-A.2.2.

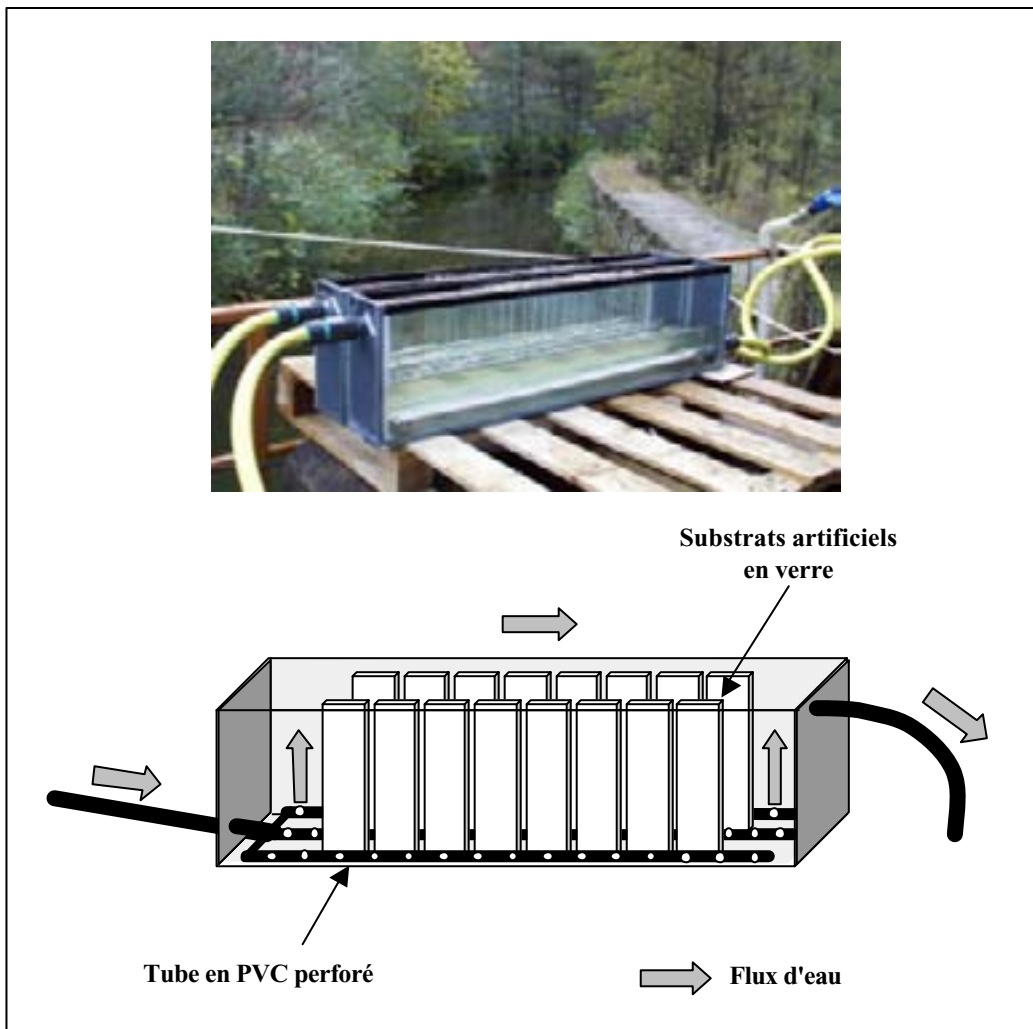


Figure 31 : Structure des canaux expérimentaux (100 x 31 x 12 cm) contenant deux rangées de 8 substrats artificiels (30 x 6 cm).

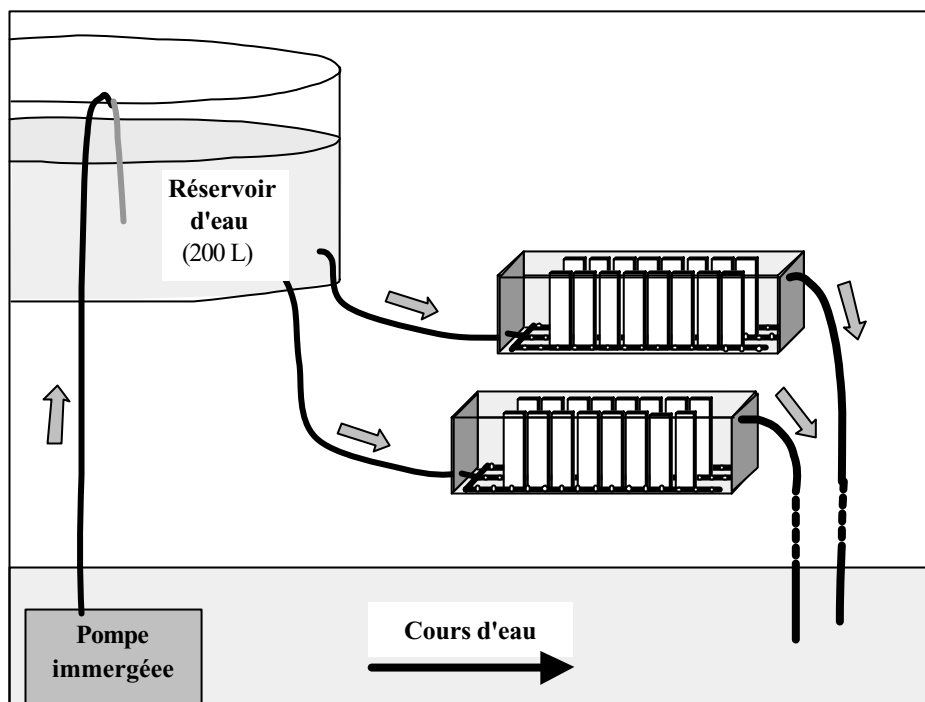


Figure 32 : Système mis en place sur la berge des cours d'eau pour assurer l'alimentation en eau des canaux expérimentaux.

"résidentes" des stations polluées, qui ont pu développer des mécanismes d'adaptation aux métaux (Jensen and Rystad 1974, Harding and Whitton 1976, Say *et al.* 1977, Foster 1982, Wang 1986, Takamura *et al.* 1989, Jin *et al.* 1996, Ivorra *et al.* 2000 b). De ce fait, elle se distingue des autres expériences de terrain présentées dans la littérature, réalisées au sein de canaux expérimentaux connectés à une rivière non polluée et contaminés en métaux par l'expérimentateur, au cours desquelles les mécanismes d'adaptation à la pollution ne pouvaient pas être pris en compte (Eichenberger *et al.* 1981, Weber and McFarland 1981, Kaufman 1982, Leland and Carter 1984, Genter *et al.* 1987).

Dans une **deuxième étude**, nous avons suivi l'évolution structurale de communautés développées dans des canaux expérimentaux sur la station "référence", puis transférées vers la station "faiblement polluée" ou "polluée", afin d'évaluer les effets de la pollution métallique sur des communautés exposées aux métaux à une phase plus tardive de leur développement. Contrairement à la première étude, cette deuxième approche révèle les effets à court-terme de la pollution métallique, sur des communautés originaires de la station "référence", non acclimatées aux métaux et soumises à une contamination soudaine.

A-1. DESCRIPTION DES CANAUX EXPERIMENTAUX DE TERRAIN

Les canaux expérimentaux (100 x 31 x 12 cm, volume de 37 L) sont constitués de deux grandes parois verticales en verre, jointes par des cloisons en PVC. Ils contiennent chacun 16 lames de verre servant de substrats artificiels (30 x 6 cm, surface colonisable de 360 cm² *recto/verso*), insérées verticalement dans la colonne d'eau, côte à côte sur deux rangées parallèles au courant. Des tubes en PVC perforés, placés dans le fond des canaux, permettent d'homogénéiser l'arrivée d'eau sur toute la longueur du canal (**Figure 31**).

Au niveau de chaque station d'étude, les canaux ont été placés sur la berge du cours d'eau. Ils ont été alimentés en continu avec de l'eau de la rivière, par l'intermédiaire d'un réservoir de 200 L placé également sur la berge et connecté à une pompe immergée dans le cours d'eau (**Figure 32**). Le débit au sein des canaux a été établi à 3 L.min⁻¹ en moyenne, correspondant à une vitesse de courant estimée proche du cm.s⁻¹ dans les canaux. Des bâches opaques¹ ont été tendues au-dessus des canaux expérimentaux, pour limiter les variations de

¹ Les bâches ne sont pas visibles sur les photographies de la **Figure 30**, prises avant le début de l'expérience.

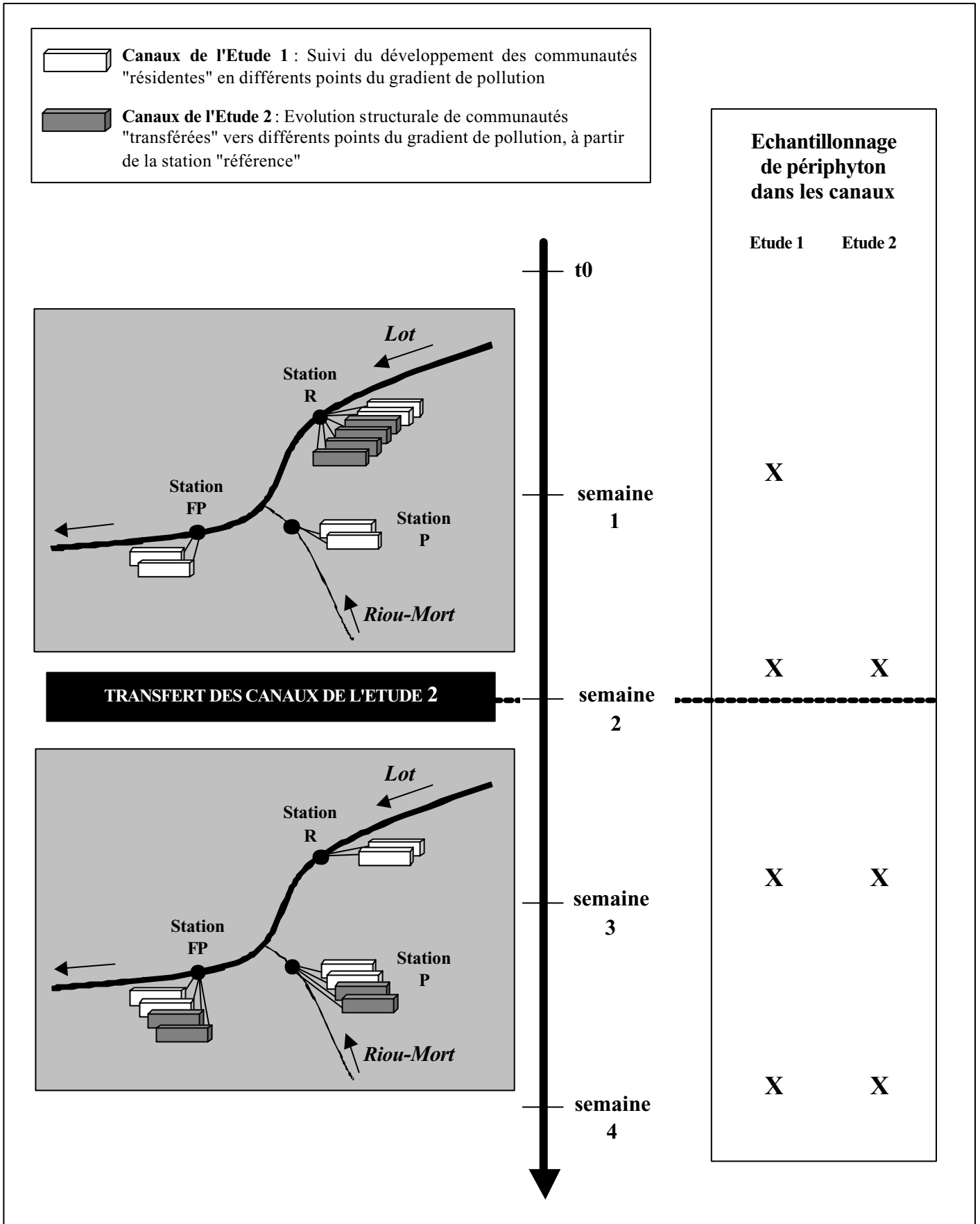


Figure 33 : Protocole des 2 études menées en conditions semi-contrôlées sur la rivière Lot et le Riou-Mort.

leur niveau d'ensoleillement et homogénéiser ainsi les conditions lumineuses entre les trois stations d'étude.

A-2. DESCRIPTION DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Pour la **première étude**, deux canaux expérimentaux ont été installés au niveau de chaque station (R, FP et P) et sont restés en place durant un mois (**Figure 33**). Des échantillons de périphyton ont été collectés après 1, 2, 3 et 4 semaines de colonisation dans chaque canal, conduisant à réaliser deux répétitions par station d'étude (une répétition par canal).

Pour la **deuxième étude**, quatre canaux supplémentaires ont été installés sur la station "référence" (R) au début de l'expérience. A la fin de la deuxième semaine de colonisation, deux de ces canaux (appelés T_{FP}) ont été transférés vers la station "faiblement polluée" (FP), et les deux autres (appelés T_P) ont été transférés vers la station "polluée" (P) (**Figure 33**). Au moment du transfert, les canaux, vidés de leur eau sur la station "référence", ont été rapidement transportés vers la station d'accueil et immédiatement remplis d'eau (durée totale d'émersion des substrats artificiels inférieure à 20 minutes). Des échantillons de périphyton ont été collectés dans chaque canal juste avant le transfert (semaine 2 de l'expérience), puis 1 et 2 semaines après le transfert (semaines 3 et 4), conduisant à réaliser deux répétitions par condition expérimentale (une répétition par canal).

L'échantillonnage de périphyton a été réalisé à partir du prélèvement de trois substrats artificiels occupant différentes positions (entrée, milieu, sortie) dans chaque canal. Des substrats artificiels vierges ont immédiatement remplacé les substrats prélevés, pour assurer la conservation de conditions identiques de circulation d'eau au sein des canaux.

A la fin de la période expérimentale, des **communautés périphytiques naturelles** ont été échantillonnées sur des substrats du lit des cours d'eau (cailloux, galets). Deux substrats naturels ont été prélevés sur chaque station d'étude, conduisant à réaliser deux répétitions par station.

Pendant toute la période expérimentale, les **facteurs abiotiques** de la colonne d'eau ont été analysés très régulièrement au niveau des trois stations d'étude, dans les canaux expérimentaux et dans le cours d'eau. Les paramètres physico-chimiques classiquement pris en compte (température, pH, conductivité, concentration en oxygène dissous), la turbidité, les concentrations en cadmium et en zinc et l'intensité lumineuse au niveau des substrats ont été

mesurés quatre fois par semaine, nécessitant une présence continue sur le site durant toute la durée des expériences. Les concentrations en nutriments (phosphates, sulfates et nitrates) ont été déterminées après 10, 20 et 28 jours d'expérience.

Les méthodologies d'échantillonnage du périphyton et d'analyse de la structure des communautés de diatomées et des facteurs physico-chimiques de la colonne d'eau sont détaillées dans la Partie II de ce mémoire.

**B- COMPARAISON DE LA STRUCTURE
DES COMMUNAUTES DE DIATOMÉES "RESIDENTES"
DEVELOPPEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX
LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION :
évaluation en conditions semi-contrôlées
des effets de la pollution métallique sur des communautés
exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement**

*Impacts of metals (Cd, Zn) on the development of periphytic diatom communities
within outdoor artificial streams along a pollution gradient¹*

Gold Caroline ^(1,2), Feurtet-Mazel Agnès ^{(1)*}, Coste Michel ⁽²⁾, Boudou Alain ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), Université Bordeaux 1,
Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

⁽²⁾ Cemagref, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France

* Corresponding author. Tel.: + 33 (0) 5-56-22-39-20; fax: + 33 (0) 5-56-54-93-83. E-mail address: a.feurtet-
mazel@ecotox.u-bordeaux.fr

KEYWORDS

Periphyton - Microalgae - Diatoms - Cadmium - Zinc - Artificial stream

¹ Article soumis à *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* en décembre 2001.

ABSTRACT

An original methodology was developed to assess *in situ* effects of metal pollution on periphytic diatom communities. Artificial streams were placed on the river bank at three sites along the pollution gradient (Cd/Zn) of the River Lot (SW France): reference (upstream pollution discharge), slightly polluted (around 1.5 µg Cd.L⁻¹ and 50 µg Zn.L⁻¹) and polluted (around 6 µg Cd.L⁻¹ and 400 µg Zn.L⁻¹) sites. Structural characteristics of diatom communities growing in these artificial streams, on glass substrates and under homogenized current velocity and water depth, were compared after four colonization durations (1, 2, 3 and 4 weeks). Marked perturbations of diatom community development were observed in the polluted site, leading to a significantly lower cell density and to a very different taxonomic composition after four weeks. Metallic pollution was therefore suspected to strongly affect global diatom community architecture, and to induce the formation of abnormal cells.

INTRODUCTION

Benthic and periphytic algal assemblages are the most successful primary producers to exploit running waters. Because they are composed of a large number of species with various ecological tolerances and preferences, they constitute a well adapted biological model for environmental monitoring (U.S. E.P.A. 2001). Periphytic diatoms in particular are widely employed as ecological indicators of river organic pollution (Descy and Coste 1991) and eutrophication (Kelly and Whitton 1995).

Modifications of the structural characteristics of periphytic diatom communities under metal pollution have been revealed by several field studies (Rushforth *et al.* 1981, Deniseger *et al.* 1986, Ivorra *et al.* 1999, Sabater 2000). Nevertheless, even if the sites selected for such studies show clear differences in metal concentrations, variations in other environmental factors of natural and/or anthropogenic origin are inevitable between such sites, and prevent conclusions being drawn on the real impact of metallic pollution. A few studies have been conducted in outdoor artificial streams, supplied with unpolluted river water and submitted to controlled metal additions (Leland and Carter 1984, Genter *et al.* 1987). These experimental protocols allow to standardize some of the environmental factors between the different contamination levels (current velocity, water depth, substrate nature, etc.), but they do not take into account the metal

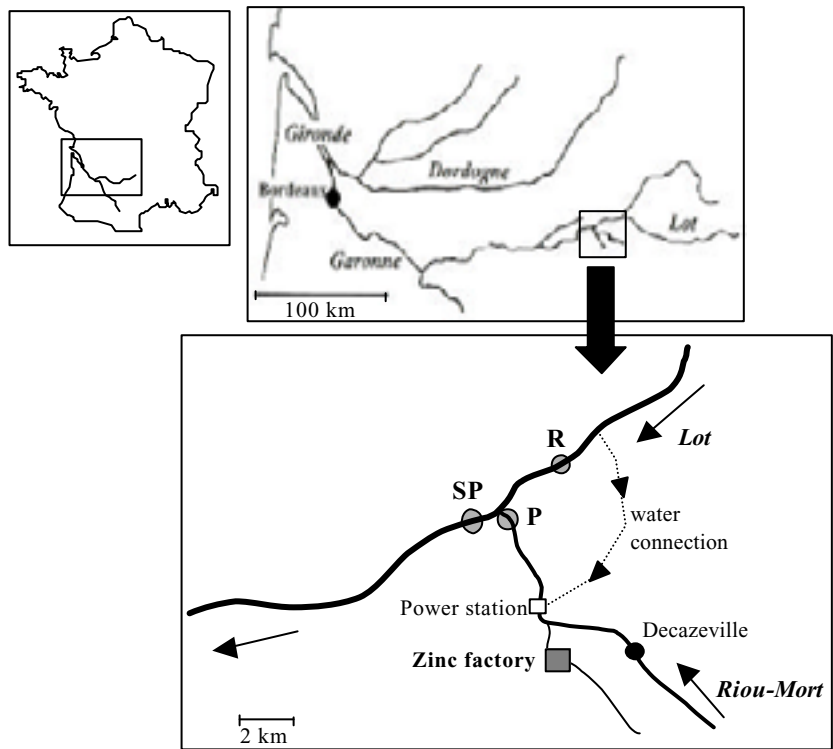


Figure 34: Location of the River Lot and of the three experimental sites along the polymetallic pollution gradient: reference (R, River Lot), slightly polluted (SP, River Lot), and polluted (P, Riou-Mort) sites.

adaptation mechanisms that can occur in long-term contaminated environments, and which have been demonstrated for different algal species (Whitton 1980, Takamura *et al.* 1989).

In the present paper, we present the results of an original approach developed to study *in situ* effects of metals on the structure of periphytic diatom communities, combining the advantages of both approaches previously described. This experiment was conducted in the fall (November-December 1998), when diatoms are dominant in benthic algal assemblages (Whitton 1980). Flow-through artificial streams were placed on the river bank at three sites along a polymetallic pollution gradient (Cd/Zn), located in the industrial basin of Decazeville (South-West France): reference (R), slightly polluted (SP) and polluted (P) sites. Density and taxonomic composition of diatom communities growing in these artificial streams, under homogenized current velocity, water depth and substrate nature, were compared after four colonization durations (1, 2, 3 and 4 weeks).

MATERIAL AND METHODS

Study sites

The industrial basin of Decazeville (South-West France) is located in the middle section of the River Lot (**Figure 34**). Since the end of the last century, the Riou-Mort, a small tributary of the Lot, has carried seepage from a former zinc factory and is responsible for metal inputs into the Lot, mainly based on Cd and Zn discharge. Three study sites presenting different metal pollution levels were selected in these streams: (i) the reference (R) site, located on the River Lot, about 4 km upstream from the junction with the Riou-Mort, and showing very low metal concentrations in the water column and sediment compartments, similar to the background levels in this area (Andres *et al.* 1999) ; (ii) the polluted (P) site, located directly on the Riou-Mort, just above its confluence with the River Lot ; (iii) the slightly polluted (SP) site, located downstream on the River Lot, about 300 m after the junction with the Riou-Mort. Here the metallic effluent discharged into the Riou-Mort is diluted after the confluence with the Lot.

The river Lot and the Riou-Mort are combined, with water pumped into the Lot, upstream of the R site, to cool a power station located on the Riou-Mort, upstream of the P site (**Figure 34**). Stream microorganisms from the Lot are therefore regularly introduced into

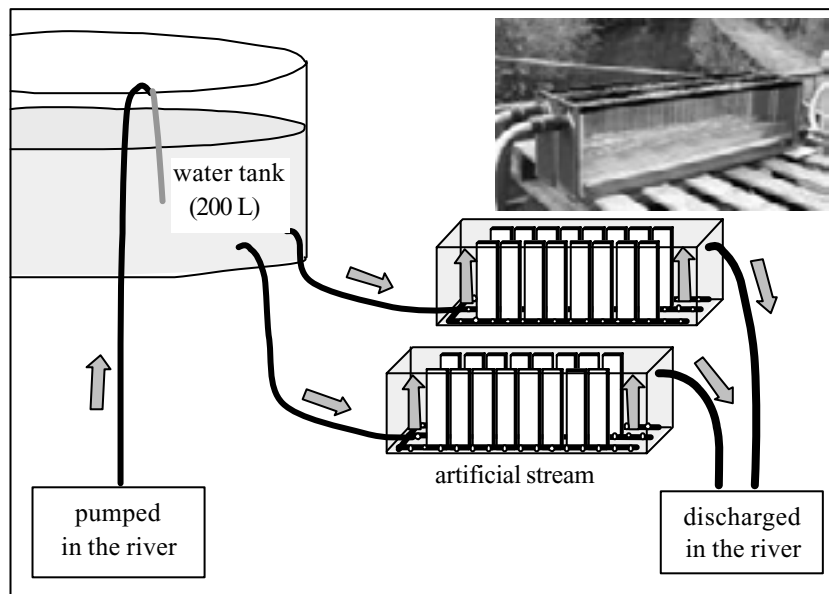


Figure 35: Experimental system set-up on the river bank at each site, composed of two artificial streams (100 x 31 x 12 cm, 37 L volume) connected to a water tank filled by a pump submerged in the river. Artificial streams contained 2 racks of 8 glass substrates (30 x 6 cm). Grey arrows show the direction of water flow.

the Riou-Mort, allowing homogenization between the three sites (R, FP and P) of the immigrating group of diatoms that can potentially colonize substrates.

Periphyton sampling methodology

Flow-through artificial streams are made from long, lateral glass plates and ending in two PVC walls (100 x 31 x 12 cm, 37 L volume), each containing 16 vertical glass substrates (30 x 6 cm, 360 cm² surface for both sides) inserted side by side into two racks parallel to the current (**Figure 35**). Two artificial streams were placed at each site on the river bank, and were connected to a 200 L water tank filled by a pump submerged in the river (**Figure 35**). The artificial streams were continuously supplied with river water at a rate of 3 L.min⁻¹, corresponding to a current velocity of 0.15 cm.s⁻¹ in the streams.

Periphyton samples were collected from each artificial stream after 1, 2, 3 and 4 weeks of colonization, by removal of three glass substrates occupying different positions in the stream (entry, middle and end). After periphyton sampling, the artificial streams were reset with blank glass slides, to preserve identical internal flow conditions. Material from the three substrates was removed with a cutter blade, diluted to a standard volume of 240 mL of water and preserved in a 5% formalin solution (Formol 37%).

Water column physical and chemical characteristics and metal concentrations

Temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen concentration (WTW, Weilheim, Germany) and turbidity (HANNA, Woonsocket, RI, USA) were measured four times per week *in situ*, both in the artificial streams and in the rivers. The instantaneous light intensity received by the artificial substrates was measured at 15 cm depth in the water column of the artificial streams (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

Artificial stream and river water samples were collected using clean techniques and brought back to the laboratory for nutrient and metal measurements. Phosphate, sulphate and nitrate concentrations were determined after 10, 20 and 28 days, by liquid chromatography. Water samples for metal measurements (Cd and Zn) were collected four times per week. Samples for total recoverable metals were preserved by acidification with HNO₃ (2%), and kept refrigerated. Samples for dissolved metals were filtered in the field (0.45 µm polycarbonate Cyclo-pore filters - Autotop WF, Polylabo) before acidification. Cd concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry (Varian AA400 – Zeeman correction, Victoria, Australia),

equipped with a graphite tube atomiser (model GTA96, Varian) and autosampler, and Zn concentrations by flame atomic absorption spectrometry (Varian AA20). More details can be found in Andres *et al.* (1999).

Analysis of diatom assemblages

Diatom density was estimated in each sample using a Nageotte counting chamber, by enumerating the total number of diatoms in 30 fields (1.25 μL each, 0.5 mm depth), using light microscopy at 200 x magnification (photomicroscope Leica DMRB, Wetzlar, Germany). Data were reported as cells per unit area of substrate sampled (cells.cm^{-2}).

Diatom species were identified at 1,000 x magnification, by examining permanent slides of cleaned diatom frustules, digested in boiling H_2O_2 (30%) and HCl (35%), and mounted on a microscope glass slide in a high refractive index medium (Naphrax, Northern Biological Supplies Ltd, UK; RI = 1.74). 400 diatom valves were identified on each slide, according to the Krammer and Lange-Bertalot classification (1986, 1988, 1991a, 1991b). Relative abundances of the species (in percentage) and species richness were estimated, and diatom diversity was calculated using the Shannon-Weaver index.

Data analyses

To study the effect of site (R, SP and P) and/or colonization duration (1, 2, 3 and 4 weeks) on species richness, diversity and diatom density, we performed ANOVA methods (one or two factors) using STATISTICA Software (Version 5, 97 Edition), after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term). If the null hypothesis was rejected, we used Least Square Deviation test (LSD), to detect significant differences between groups. For all statistical results, a probability of $P < 0.05$ was considered significant.

A principal component analysis (PCA) was performed with SPAD Software (version 4) on data concerning relative abundances of diatom species, to reveal taxonomic differences between diatom communities collected during the experiment. Only the relative abundances of 55 species were considered (the 55 species that had the highest cumulative relative abundances when all the samples were taken into account).

Parameter	River Lot								Riou-Mort			
	Reference (R) site				Slightly polluted (SP) site				Polluted (P) site			
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
Turbidity (FTU)	7.7 (1.9)	4.9 (3.2)	9.8 (3.5)	7.4 (1.1)	9.4 (2.3)	6.3 (2.5)	10.9 (5.8)	12.2 (8.1)	11 (1)	12.8 (5.5)	10.8 (4.6)	46.5 (45.5)
pH	7.9 (0.08)	7.7 (0.1)	7.7 (0.04)	7.7 (0.1)	7.8 (0.08)	7.8 (0.1)	7.7 (0.07)	7.7 (0.2)	7.8 (0.09)	7.7 (0.1)	7.7 (0.08)	7.8 (0.01)
O ₂ (mg.L ⁻¹)	11.1 (0.7)	10.9 (0.9)	11.3 (0.9)	12.3 (2.5)	11.7 (1.4)	10.4 (2.3)	11 (4.2)	10.6 (2.3)	12 (1.9)	11.5 (1.3)	10.6 (1.5)	9.8 (0.2)
Conductivity (μS.cm ⁻²)	148 (10)	131 (18)	111 (10)	116 (34)	190 (15)	195 (22)	153 (14)	178 (50)	408 (75)	409 (31)	394 (16)	582 (5)
T (°C)	7.8 (1.3)	5.3 (1)	5.6 (0.5)	5.3 (1)	8.3 (1.2)	6.9 (1.2)	6.7 (0.7)	6 (0.5)	12.4 (2.4)	14.6 (1.3)	14.4 (0.4)	8.1 (1.1)
Light intensity ^a (μmol.s ⁻¹ m ⁻²)	52 (39)	27 (16)	27 (9)	15 (9)	54 (21)	53 (35)	55 (20)	33 (21)	48 (41)	43 (21)	24 (12)	18 (9)
Total Cd (μg.L ⁻¹)	< 0.1 ^b	< 0.1 ^b	< 0.1 ^b	< 0.1 ^b	1.7 (0.05)	1.6 (0.2)	1.7 (1.1)	1.6 (0.3)	9.5 (1)	7.7 (0.2)	7.6 (0.8)	9.9 (2.3)
Dissolved Cd (μg.L ⁻¹)	< 0.1 ^b	< 0.1 ^b	< 0.1 ^b	< 0.1 ^b	1.3 (0.05)	1.4 (0.6)	0.9 (0.5)	0.8 (0.2)	7.9 (0.3)	5.5 (1.7)	5 (0.5)	5.5 (2.2)
Total Zn (μg.L ⁻¹)	< 10 ^b	< 10 ^b	< 10 ^b	< 10 ^b	69 (19)	68 (32)	32 (4)	52 (13)	645 (144)	443 (127)	416 (72)	543 (121)
Dissolved Zn (μg.L ⁻¹)	< 10 ^b	< 10 ^b	< 10 ^b	< 10 ^b	61 (16)	57 (37)	26 (26)	34 (14)	572 (130)	375 (150)	334 (42)	428 (106)

Table 2: Physical and chemical characteristics measured in the water column of the artificial streams during the four weeks exposure period (November-December 1998), at the three sites along the polymetallic pollution gradient: reference (R), slightly polluted (SP), and polluted (P) sites (weekly mean and standard deviation in brackets, n=4).
(a): measured at 15 cm depth in the water column
(b): < detection limit (0.1 μg.L⁻¹ for Cd and 10 μg.L⁻¹ for Zn)

Nutrients (mg.L ⁻¹)	River Lot		Riou-Mort
	Reference (R) site	Slightly polluted (SP) site	Polluted (P) site
PO ₄ ²⁻	< 0.1 ^a	< 0.1 ^a	< 0.1 ^a
NO ₃ ⁻	3.7 (1.1)	4.2 (1.1)	6.9 (0.9)
SO ₄ ²⁻	4.3 (0.8)	20.7 (1.9)	103.7 (16.2)

Table 3: Nutrient concentrations measured in the water column of the artificial streams during the four weeks exposure period (November-December 1998), at the three sites along the polymetallic pollution gradient: reference (R), slightly polluted (SP), and polluted (P) sites (mean value and standard deviation in brackets, n=3).
(a) : < detection limit

RESULTS

Water column physical and chemical parameters and metal concentrations

Physical and chemical parameters measured in the artificial streams are shown in **Table 2**. Values measured simultaneously in the rivers are not presented here, but were fairly similar to those in the artificial streams at each site. The pH was around 8 at all sites, and the dissolved oxygen was always $> 9.8 \text{ mg.L}^{-1}$ ($> 80\%$ of saturation). Water turbidity was also fairly constant, apart from a high mean value in the polluted (P) site during week 4. Water conductivity, on the other hand, increased between sites, coinciding with the metal gradient. Water temperatures were relatively low in the River Lot ($5\text{-}7^\circ\text{C}$), and significantly higher in the P site (around 13°C), except at the end of the experiment (P, week 4). Light intensities in the water columns of the artificial streams did not differ significantly between sites, but decreased at all sites at the end of the experiment. In **Table 3**, phosphate concentrations were below the detection limit (0.1 mg.L^{-1}) at all sites, whereas nitrate concentrations were significantly higher in the P site, and sulphate concentration increased markedly with the pollution gradient.

Cd and Zn concentrations measured in the water samples collected in the reference (R) site were below the detection limits in the total and dissolved phases (**Table 2**). In the polluted (P) site, average concentrations in the filtered samples were close to $6 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ and $400 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$. Analysis of unfiltered water samples showed that a large proportion of the two metals was distributed in the dissolved phase: 69% of Cd and 80% of Zn on average. In the slightly polluted (SP) site, total metal concentrations in the water were much lower than those measured in the P site, with mean values close to $1.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Cd and $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Zn. Dissolved forms of both metals were still predominant, with 66% for Cd and 80% for Zn.

Global characterization of diatom communities

After one week of colonization, biofilms were thin and patchy at all sites, with very low diatom densities ($< 1,000 \text{ cells.cm}^{-2}$, **Figure 36**). Afterwards, densities increased significantly in the reference (R) and slightly polluted (SP) sites until the end of the experiment, reaching around $120,000 \text{ cells.cm}^{-2}$ after four weeks. Substrates were then uniformly colonized by a thick, dark-brown layer. In the polluted (P) site, diatom densities increased significantly during the second week of colonization, and values observed after two weeks were significantly higher than in the R and SP sites. Diatom growth then stopped in the

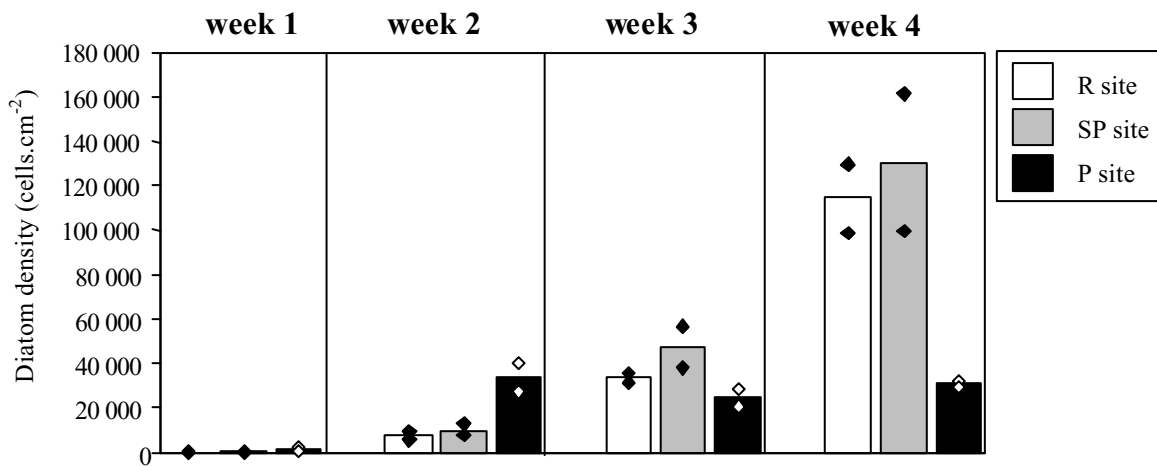


Figure 36: Diatom densities (mean value and replicates, n=2) on artificial substrates (cells.cm⁻²) after 1, 2, 3 and 4 weeks of colonization at the three sites along the polymetallic pollution gradient: reference (R), slightly polluted (SP), and polluted (P) sites.

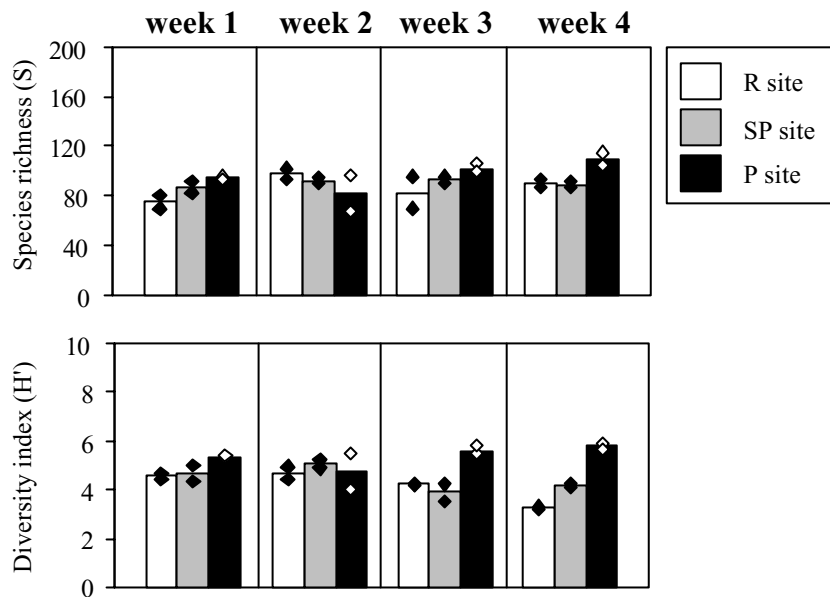


Figure 37: Species richness (S) and Shannon-Weaver diversity index (H') of diatom communities (mean value and replicates, n=2) collected after 1, 2, 3 and 4 weeks of colonization at the three sites along the polymetallic pollution gradient: reference (R), slightly polluted (SP), and polluted (P) sites.

P site, and densities stayed around 30,000 cells.cm⁻² until the end of the experiment. After four weeks of colonization, densities in the P site were therefore significantly lower than in the R and SP sites, and biofilms were uniform but very thin and addressed onto the substrates.

Global qualitative characterization of diatom communities was given by their species richness (S) and diversity index (H') (**Figure 37**). No significant difference in species richness appeared between sites or between colonization durations, according to two-way ANOVA results, with around 80 diatom species in each sample. On the other hand, diversity indices in the reference (R) and slightly polluted (SP) sites (around 4) fell significantly lower than in the polluted (P) site (around 6) after three and four weeks of colonization.

Taxonomic composition of diatom communities

Results of the PCA based on relative abundances of diatom species are shown in **Figure 38**. Axes 1 and 2 account for around 24% and 15% of the total variation respectively. Axis 1 separates diatom communities developed in the reference (R) and slightly polluted (SP) sites, on the right half plane (positive values), from communities developed in the polluted (P) site, on the left half plane (negative values) (**Figure 38 a**). Separation along this axis results mainly from greater relative abundances of *Melosira varians* (MVAR) and *Nitzschia dissipata* (NDIS) in the R and SP sites, mostly after three or four weeks of colonization, and from higher relative abundances of 14 other species in the P site (**Figure 38 b**). Abnormal frustules of the species *Fragilaria capucina* var. *gracilis* (called *F. capucina* var. *gracilis* fo. *teratogene*, FCGT), presenting bent or twisted valves in the medium part, were found in both polluted sites (**Figure 38 b**), with relatively low mean relative abundances (< 3 %). Predominance of *M. varians* and *N. dissipata* proportions in the reference (R) and slightly polluted (SP) sites was confirmed by the cumulative histograms of species' relative abundances (**Figure 39**), with a strong increase of these species as colonization proceeded. In the P site, on the other hand, relative abundances of these species did not override those of other taxa (**Figure 39**).

Axis 2 (**Figure 38 a**) clearly separates diatom communities collected in the three sites after the first week of colonization, with higher negative values, from communities collected during the later stages of colonization. Separation along this axis results mainly from higher relative abundances of three species during the earlier stages of colonization (**Figure 38 b**): *Diatoma vulgare* (DVUL), *Fragilaria crotonensis* (FCRO), a planctonic form trapped in the biofilm, and *Cocconeis placentula* var. *lineata* (CPLI). Representation of species' relative abundances (**Figure 39**) show that proportions of *F. crotonensis* and *D. vulgare* decreased

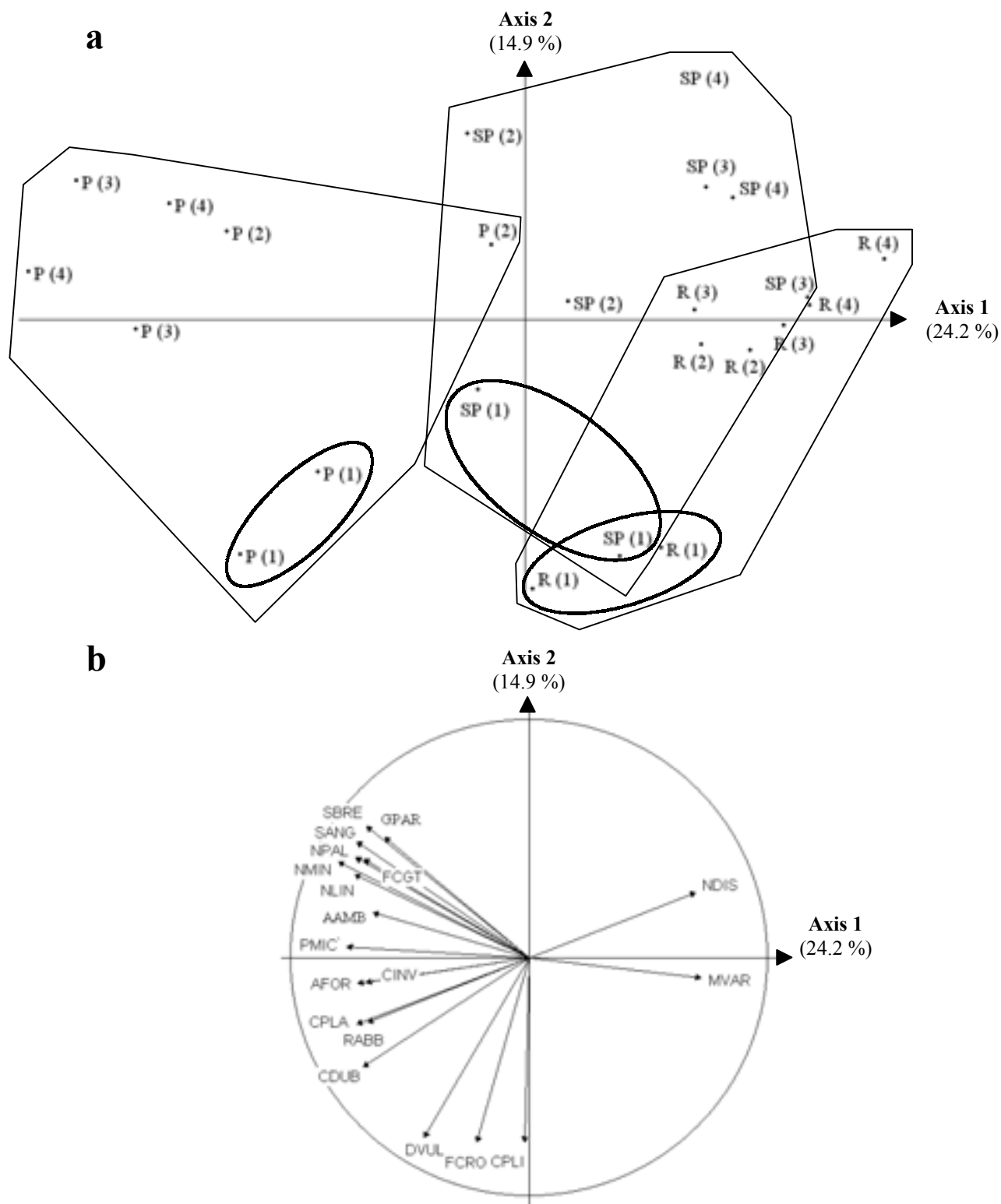


Figure 38: Principal component analysis (PCA) based on the relative abundances of species in diatom communities collected at the three sites along the polymetallic pollution gradient: reference (R), slightly polluted (SP), and polluted (P) sites, for the four colonization durations: 1, 2, 3 and 4 weeks.

Only the 55 species that had the highest cumulative relative abundances when all samples were taken into account, were considered.

(a) Projection of the diatom communities on the first two principal components axes (2 replicates per site). Colonization duration is indicated in brackets (1, 2, 3 and 4 weeks).

(b) Projection of the diatom species on the correlation circle. Only the 17 species with loading > 0.60 for one of the two axes are plotted on the graph.

(AAMB: *Aulacoseira ambigua*, AFOR: *Asterionella formosa*, CDUB: *Cyclostephanos dubius*, CINV: *Cyclostephanos invisitatus*, CPLA: *Cocconeis placentula*, CPLI: *Cocconeis placentula* var. *lineata*, DVUL: *Diatoma vulgare*, FCGT: *Fragilaria capucina* var. *gracilis* fo. *teratogene*, FCRO: *Fragilaria crotonensis*, GPAR: *Gomphonema parvulum*, MVAR: *Melosira varians*, NDIS: *Nitzschia dissipata*, NLIN: *Nitzschia linearis*, NMIN: *Navicula minima*, NPAL: *Nitzschia palea*, PMIC: *Pinnularia microstauron*, RABB: *Rhoicosphenia abbreviata*, SANG: *Surirella angusta*, SBRE: *Surirella brebissonii*).

within all communities after the first week of colonization, especially in the R and SP sites, while a temporary increase of *Achnanthydium minutissimum* (AMIN) was observed in the P site after two weeks.

DISCUSSION

Water column physical and chemical characteristics and metal pollution levels

Physical and chemical measurements performed in the artificial streams revealed numerous similarities between the three sites (**Table 2**). Light levels were similar at all sites, resulting both from standardized water depth and relatively homogeneous water turbidity. The decrease in light intensities observed at the end of the experiment at all sites was due to weather conditions (cloudy period). The high water turbidity measured in the polluted (P) site during week 4 (**Table 2**) could be related to a period of heavy rain and to the resulting stirring of sediments in the Riou-Mort. Chemical factors such as pH and dissolved oxygen were identical in all three sites. Higher temperatures, however, were observed in the polluted (P) site, due to the activity of the power station located upstream of the sampling site. They were no longer noticed at the end of the experiment (P site, week 4), when the activity of this station was interrupted. Sulphate and nitrate concentrations (**Table 3**) presented also higher values in the polluted (P) site. Independently of metal concentrations in the water, higher temperatures and nutrient concentrations are predicted to stimulate global algal growth (Biggs 1996), so physicochemical characteristics in the polluted (P) site could be considered as more favourable for periphytic diatom development. High nutrient concentrations in the P site could have affected metal toxicity to algal cells, but it is not clear whether it could have increased or decreased metal stress. Indeed, the increase of nitrate concentration has been demonstrated to decrease metal toxicity according to Rai *et al.* (1981), whereas Wang and Dei (2001) have observed an increase of Cd uptake in a coastal diatom with nitrate concentration, which could lead to increase metal stress.

Metal measurements confirm the polymetallic gradient between the three sites (**Table 2**). Cd and Zn concentrations were around the U.S. E.P.A. water quality criteria ($< 2 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ or $190 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$, U.S. E.P.A. 2001) in the slightly polluted (SP) site, and just above in the polluted (P) site. Our study therefore pointed out the effects of relatively low metal concentrations,

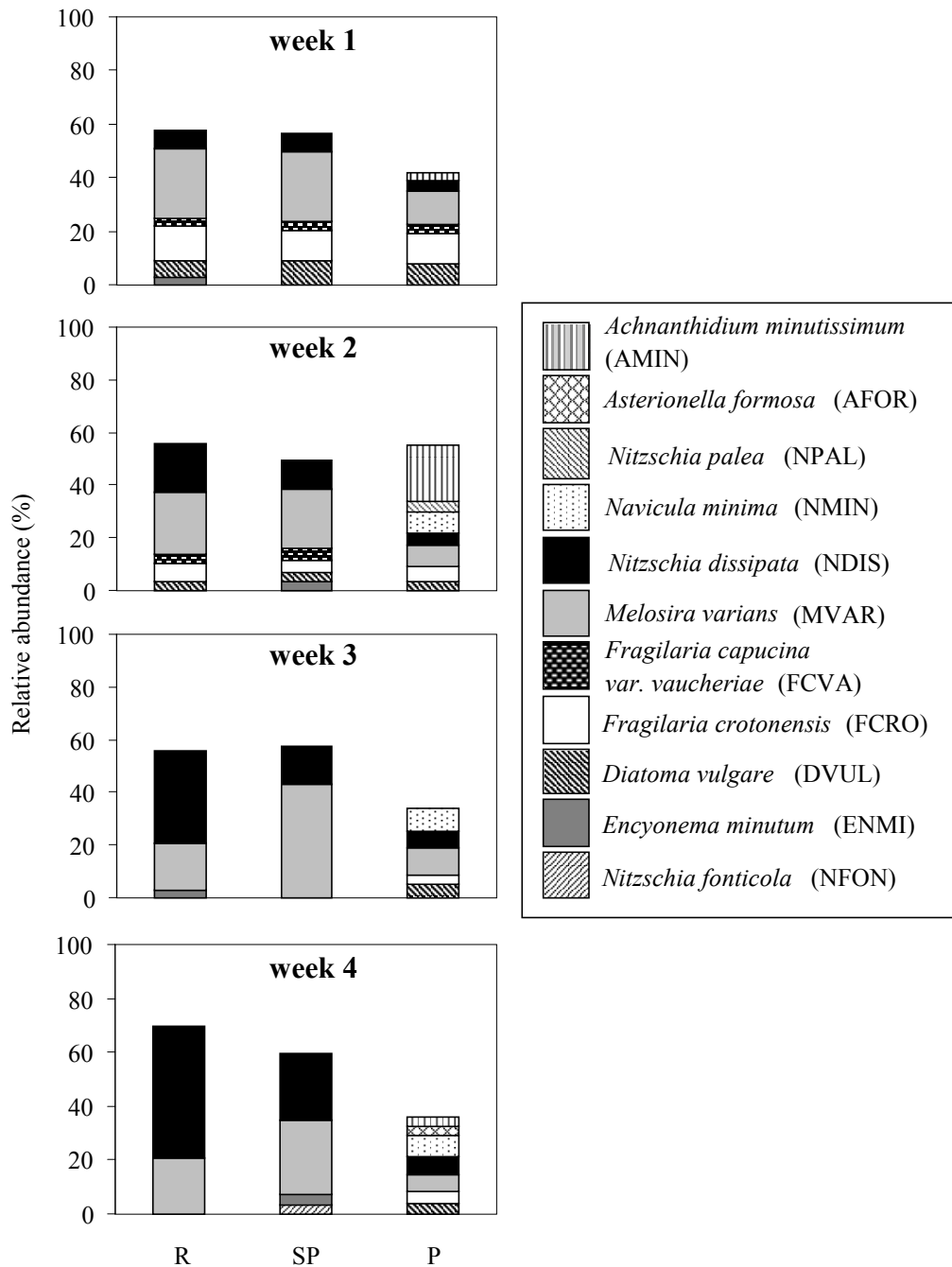


Figure 39: Relative abundances (mean value, n=2) of the diatom species with mean relative abundance > 3%, after 1, 2, 3 and 4 weeks of colonization at the three sites along the polymetallic pollution gradient : reference (R), slightly polluted (SP), and polluted (P) sites.

whereas most of the previous field studies on benthic algal communities have been carried out under much more higher pollution levels, $> 300 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ and $3,000 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$ (Rushforth *et al.* 1981, Ivorra *et al.* 1999).

Analysis of diatom assemblages

The weekly periphyton samplings performed throughout the experiment enabled us to follow the different stages of substrate colonization along the pollution gradient. In the three sites, colonization began with the development of a basal layer of periphytic diatoms, very thin onto the substrates ($< 1,000 \text{ cells.cm}^{-2}$, **Figure 36**) and presenting similar taxonomic compositions (**Figure 39**). In the reference (R) and slightly polluted (SP) sites, densities progressively increased with colonization duration and reached around $120,000 \text{ cells.cm}^{-2}$ after four weeks (**Figure 36**). Substrates were then covered by a thick, tri-dimensional dark-brown layer, consisting mainly of two species (**Figure 39**): the filament-forming *M. varians*, and *N. dissipata*, a motile algae that can actively move through the top layer (Biggs 1996).

In the most polluted (P) site, biofilm evolution was very different. A stronger increase of diatom density was observed during the second week of colonization (**Figure 36**), related to a very high development of *Achnantheidium minutissimum* (**Figure 39**). This earlier growth could be explained by higher temperatures and nutrient concentrations in the P site (**Tables 2 and 3**). Nevertheless, the strong increase of density and the high development of *M. varians* and *N. dissipata*, observed afterwards in the R and SP sites, were inhibited in the P site (**Figures 38 and 39**). After four weeks of colonization, community architecture in the P site was therefore very different from that in the two other sites, biofilms remaining very thin and adpressed onto the substrates. This global reduction of community development could mainly be related to long-term effects of metal pollution, other environmental differences reported between the P site and the two other sites - especially in water temperature and nutrient concentrations - being predicted to cause opposite effect (Biggs 1996). Furthermore, metal-induced perturbations of biofilm architecture, similar to those observed in the P site, have been demonstrated in laboratory experiments (Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a). The metal-sensitivity of species living in the biofilm external layer - such as *M. varians* -, can be related to their higher level of exposure to external contaminants. On the other hand, underlying algal cells - such as *A. minutissimum* -, are protected by the extracellular polymeric substances of algae and bacteria present in the biofilms (Freeman and Lock 1995), that offer high metal complexation capacities, and therefore reduce metal bioavailability and

toxicity. Note that Rose and Cushing (1970) have demonstrated, using autoradiographic techniques, that Zn penetration in biofilms was restricted to the upper layer.

The structural differences observed between communities of the polluted (P) site and those of the two other sites were revealed by the diversity index. The decrease of diversity values reported in the reference (R) and slightly polluted (SP) sites, after three and four weeks of colonization, could mainly be related to *M. varians* and *N. dissipata* proliferations. Several authors have reported opposite results, with diatom diversity and/or species richness decreasing in metal polluted sites (Deniseger *et al.* 1986, Sabater 2000), but the contamination levels in their studies were much more higher than those in our experiment.

M. varians, that was already reported to decrease in metal polluted sites (Besch *et al.* 1972, Genter *et al.* 1987, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 1999), could be suspected to be metal-sensitive. On the other hand, species like *Nitzschia palea*, *Gomphonema parvulum*, *Pinnularia* sp. or *A. minutissimum*, that showed relative abundances in the polluted site higher than in the reference site (**Figures 38 and 39**), could be suspected to be metal-tolerant. High abundances of these species have been already reported in metal polluted rivers (Rushforth *et al.* 1981, Leland and Carter 1984, Deniseger *et al.* 1986, Genter *et al.* 1987, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 1999). Development of tolerance in microalgae growing at sites subjected to metal pollution has been demonstrated by Takamura *et al.* (1989), using laboratory toxicity tests of photosynthetic activity. Different mechanisms could enable algae to tolerate chemical stress at cellular level, as for example a decrease in the number of binding sites at the cell surface, uptake inhibition, development of exclusion or internal detoxifying mechanisms (Rai *et al.* 1981). Nevertheless, the resistance to metals of *A. minutissimum* is still discussed, other authors having reported decreasing abundances of this species in polluted sites (Besch *et al.* 1972, Sabater 2000).

The presence of abnormal frustules of the species *F. capucina* var. *gracilis* in both polluted sites (SP and P) could also be related to metal stress. Diatom deformities have already been reported in areas contaminated by heavy metals (Besch *et al.* 1972, McFarland *et al.* 1997). It was suggested that metals impair normal membrane function and reduce silicic acid uptake and amino acid synthesis (Fisher and Jones 1981), leading to abnormalities during diatom silica cell wall formation.

CONCLUSION

This original approach, using artificial streams along a polymetallic pollution gradient (Cd/Zn), enabled us to follow periphytic diatom community development at various pollution levels, that were relatively low compared to previous field studies. Strong structural perturbations, however, were observed in the most polluted site: global community growth was markedly reduced, and diatom assemblage architecture was strongly affected, with biofilm top layer development inhibition. Deformities in diatom frustules were observed in the two polluted sites, supporting the hypothesis that metals could lead to the formation of aberrant cells. Our results also provide additional information on the behaviour of some diatom species in polluted environments, and the resulting deductions about the metal tolerance or sensitivity of these species were in agreement with findings of other authors. The use of diatom communities as an indicator of freshwater metallic pollution seems therefore to be conceivable, but realization of laboratory studies is necessary to complement these field results.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministère de l'Environnement, Agence de l'Eau Adour-Garonne, Aquitaine Région and Feder Aquitaine, Cemagref, within the Groupement d'Intérêt Scientifique Ecologie de l' Eau du Bassin Adour Garonne. We thank Henry Bouillard, from the LEESA, for his excellent technical assistance in the field, the CEA of Cadarache for nutrient measurements, and Hillary Koziol, from the department of Foreign Languages (University Bordeaux II), for the improvement of narrative style of the manuscript.

REFERENCES

- Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transportation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (11), 2462-2471.
- Besch, W.K., Ricard, M., Cantin, R., 1972. Benthic diatoms as indicators of mining pollution in the Northwest Miramichi River System, New Brunswick, Canada. *Int. Rev. Ges. Hydrobio.* 57(1), 39-74.
- Biggs, B.J.F., 1996. Patterns in benthic algae of streams. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 31-56.
- Deniseger, J., Austin, A., Lucey, W.P., 1986. Periphyton communities in a pristine mountain stream above and below metal mining operations. *Freshwater Biol.* 16, 209-218.
- Descy, J., Coste, M., 1991. A test of methods for assessing water quality based on diatoms. *Ver. Int. Verein. Theor. angewandte Limnol.* 24, 2112-2116.
- Fisher, N.S., Jones, G.J., 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 51, 37-56.
- Freeman, C., Lock, M.A., 1995. The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnol. Oceanogr.* 40(2), 273-278.
- Genter, R.B., Cherry, D.S., Smith, E.P., Cairns, J.Jr., 1987. Algal-periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms. *Hydrobiologia* 153, 261-275.
- Genter, R.B., Lehman, R.M., 2000. Metal toxicity inferred from algal population density, heterotrophic substrate use, and fatty acid profile in a small stream. *Environ. Tox. Chem.* 19(4), 869-878.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Tubbing, G.M.J., Kraak, M.H.S., Sabater, S., Admiraal, W., 1999. Translocation of microbenthic assemblages used for *in situ* analysis of metal pollution in rivers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 19-28.
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2000 a. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ. Toxic. Chem.* 19(5), 1332-1339.
- Kelly, M.G., Whitton, B.A., 1995. The trophic diatom index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *J. Appl. Phycol.* 7, 433-444.

- Krammer, K., Lange-Bertalot, H., 1986. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 1. Naviculaceae. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H., 1988. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H., 1991a. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H., 1991b. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 4. Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Leland, H., Carter, J.L., 1984. Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream. *Freshwater Biol.* 14, 281-296.
- McFarland, B.H., Hill, B.H., Willingham, W.T., 1997. Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. *J. Freshwater Ecol.* 12(1), 141-149.
- Medley, C.N., Clements, W.H., 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in streams: the influence of longitudinal variation. *Ecological Applications* 8(3), 631-644.
- Rai, L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D., 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.* 56, 99-151.
- Rose, F.L., Cushing, C.E., 1970. Periphyton: autoradiography of zinc-65 adsorption. *Science* 68, 576-577.
- Rushforth, S.R., Brotherson, J.D., Fungladda, N., Evenson, W.E., 1981. The effect of dissolved heavy metals on attached diatoms in the Uintah Basin of Utah, U.S.A. *Hydrobiologia* 83, 313-323.
- Sabater, S. 2000. Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guardamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *Journal of Applied Phycology* 12(2), 113-124.
- Takamura, N., Kasai, F., Watanabe, M.M., 1989. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J. Appl. Phycol.* 1, 39-52.
- U.S. E.P.A., 2001. Water pollution legal aspects, Monitoring water quality. Web site: <http://www.epa.gov>

Wang, W.-X. and Dei, R.C.H. (2001). Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). *Wat. Res.* 35(1), 315-321.

Whitton, B.A., 1980. *River Ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne.

**C- ANALYSE DE COMMUNAUTES NATURELLES
LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION
ET COMPARAISON AVEC LES COMMUNAUTES "RESIDENTES"
DEVELOPPEES DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX :
évaluation de la représentativité de nos systèmes expérimentaux
par rapport au milieu naturel**

Ce chapitre présente les résultats de l'analyse structurale des communautés de diatomées périphytiques naturelles, échantillonnées au niveau des trois stations d'étude sur des substrats du lit des cours d'eau, à la fin de la période expérimentale. L'échantillonnage de substrats naturels ne permet pas de réaliser d'analyse comparative quantitative des communautés de diatomées (récupération incomplète, surface et temps de colonisation difficile à estimer). Cependant, la comparaison de la composition spécifique des communautés naturelles avec celle des communautés développées dans les canaux expérimentaux, sur les substrats artificiels, permet d'évaluer la représentativité de nos systèmes expérimentaux par rapport au milieu naturel.

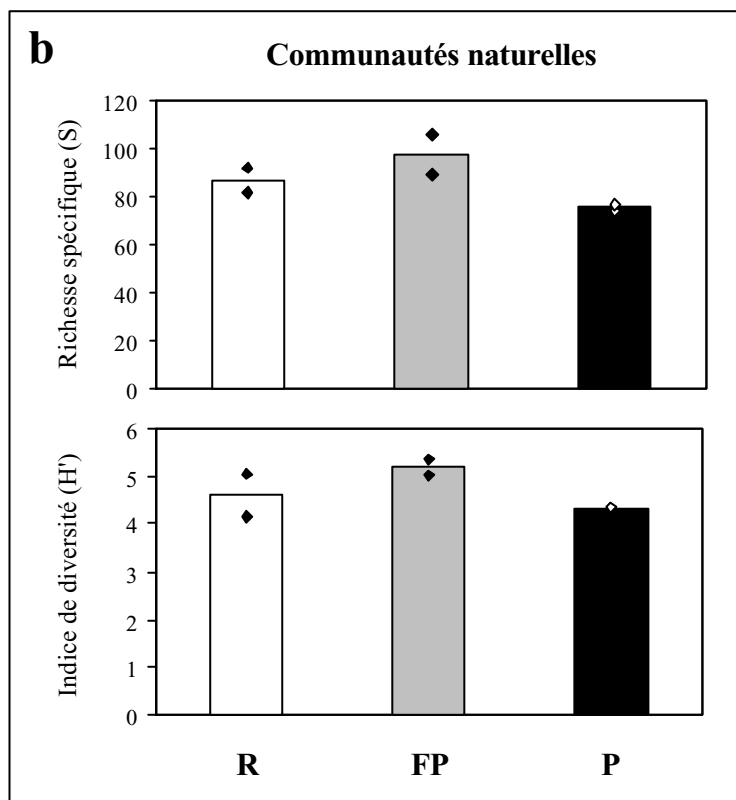
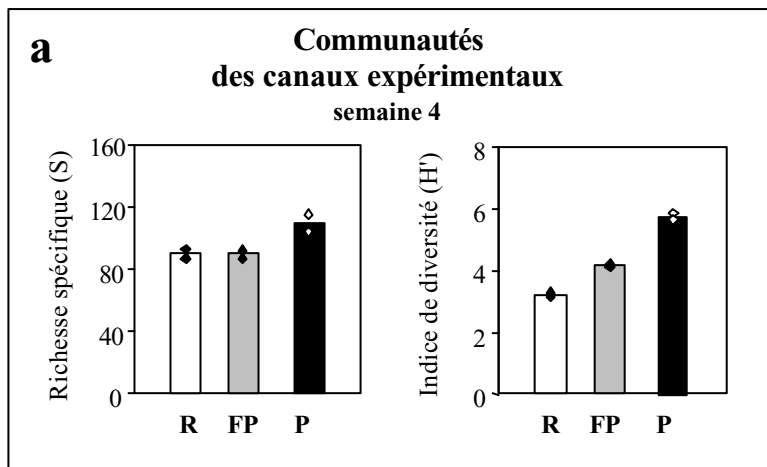


Figure 40 : Richesse spécifique (S) et indice de diversité (H') (valeurs moyennes et répétitions, n=2) des communautés de diatomées :

(a) prélevées dans les canaux expérimentaux de terrain, après quatre semaines de colonisation ;

(b) prélevées simultanément sur des substrats naturels du lit des cours d'eau, au niveau des trois stations retenues le long du gradient de pollution polymétallique : stations "référence" (R), "faiblement polluée" (FP) et "polluée" (P).

C-1. RESULTATS

C-1.1. Analyse qualitative globale des communautés de diatomées

Les communautés naturelles des trois stations d'étude ont présenté un nombre d'espèces compris entre 75 et 115 et un indice de diversité entre 4 et 5,5 (**Figure 40 b**). Ces valeurs sont comparables à celles observées au sein des canaux expérimentaux (**Figure 40 a**). Cependant, les communautés naturelles n'ont pas présenté de différence significative de richesse spécifique ni de diversité entre les trois stations d'étude, alors que la diversité au sein des canaux expérimentaux augmentait avec le niveau de pollution entre les stations R, FP et P, après quatre semaines de colonisation.

C-1.2. Composition spécifique des communautés de diatomées

Les communautés de diatomées naturelles prélevées sur les stations R et FP ont présenté une composition spécifique très différente de celles prélevées sur la station P, d'après l'analyse des abondances relatives des espèces majeures (> 3 %) au sein de chaque communauté (**Figure 41 b**). En effet, les deux espèces *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata* ont dominé les communautés naturelles des stations R et FP, avec des abondances relatives moyennes voisines de 20 % chacune sur la station R et de 15 % sur la station FP, alors que la majorité des autres espèces présentait une abondance moyenne inférieure à 3 %. En revanche, sur la station la plus polluée (P), le développement de ces deux espèces a été fortement inhibé, *M. varians* représentant moins de 3 % des communautés et *N. dissipata* 5 % en moyenne. Sept autres espèces ont présenté une abondance supérieure à 3 % sur la station P, notamment *Navicula minima* qui a atteint 30 % et *Pinnularia globiceps* presque 10 %. La présence de frustules déformés de l'espèce *Fragilaria capucina* var. *gracilis* a été observée sur les stations polluées, avec des abondances relatives moyennes très faibles (< 2 %), augmentant avec le niveau de pollution entre les stations FP et P, bien que les résultats de l'ANOVA ne révèlent pas de différence significative d'abondance de ces formes anormales entre les trois stations (**Figure 42**).

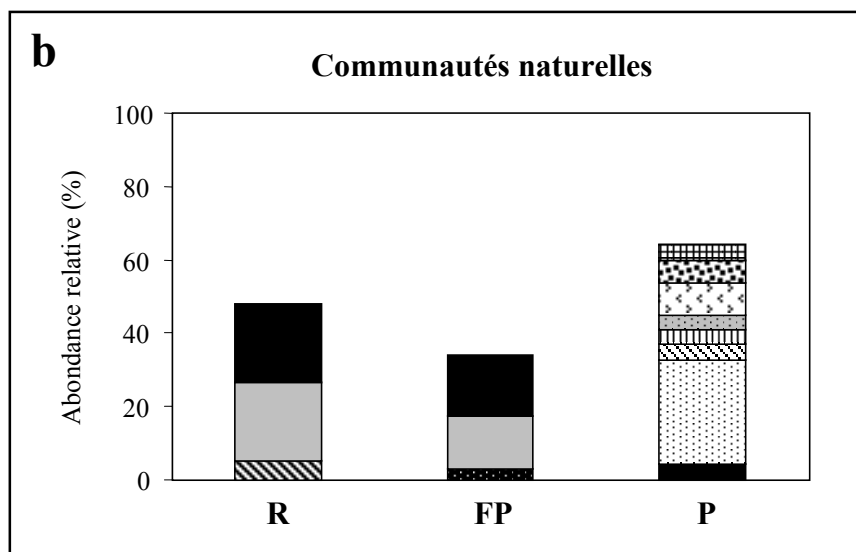
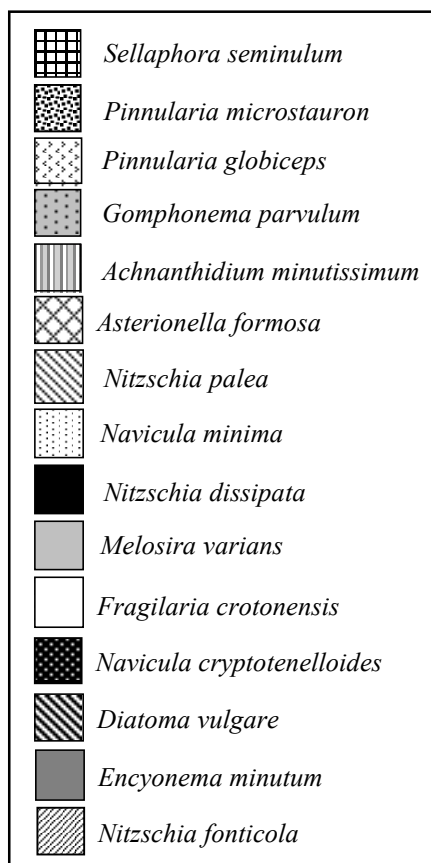
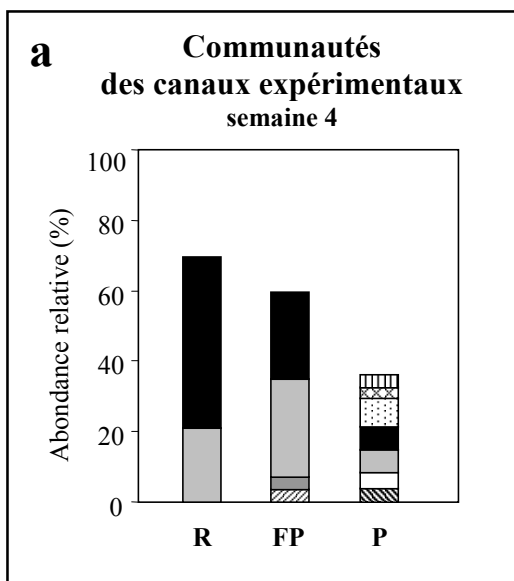


Figure 41 : Abondances relatives moyennes (n=2) des espèces majeures (abondance > 3 %) au sein des communautés de diatomées :
 (a) prélevées dans les canaux expérimentaux de terrain, après quatre semaines de colonisation ;
 (b) prélevées simultanément sur des substrats naturels du lit des cours d'eau, au niveau des trois stations retenues le long du gradient de pollution polymétallique : stations "référence" (R), "faiblement polluée" (FP) et "polluée" (P).

Ces différences de composition spécifique entre les stations d'étude sont très similaires à celles observées dans les canaux expérimentaux, après quatre semaines de colonisation (**Figure 41 a**). Toutefois, la prolifération de *M. varians* et *N. dissipata* sur les stations R et FP était plus accentuée au sein des canaux, où ces espèces représentaient à elles seules plus de 70% des communautés, et aucune espèce ne présentait de prédominance marquée sur la station P au sein des canaux.

C-2. DISCUSSION

C-2.1. Au niveau de chaque station d'étude, une grande similarité entre les communautés développées dans les canaux artificiels et les communautés naturelles, démontrant le bon niveau de représentativité de nos systèmes expérimentaux par rapport au milieu naturel

Au niveau de chaque station d'étude, la composition spécifique des communautés de diatomées périphytiques développées au sein des canaux expérimentaux a présenté de fortes ressemblances avec celle des communautés naturelles. Pourtant, alors que seules les espèces favorisées au moment de l'expérience ont pu se développer sur les substrats artificiels insérés dans les canaux, les communautés naturelles étaient potentiellement constituées de plusieurs strates d'individus qui s'étaient développées successivement sur les substrats au cours des mois précédents (depuis la dernière crue). La similarité de structure observée entre les communautés prélevées dans les canaux artificiels, représentatives uniquement de la période d'immersion des substrats, et les communautés naturelles, qui se sont développées sur une période de temps beaucoup plus longue, démontre donc le bon niveau de représentativité de nos systèmes expérimentaux par rapport aux conditions du milieu naturel.

Toutefois, des petites différences de composition spécifique ont été observées entre les deux types de communautés. Les communautés naturelles ont notamment présenté de plus importantes abondances pour plusieurs espèces, comme *Navicula minima* et *Pinnularia globiceps* sur la station P (**Figure 41**). Précisons que, contrairement aux communautés prélevées sur les substrats artificiels, les communautés naturelles ont pu contenir des espèces qui ne sont plus favorisées au moment du prélèvement, mais dont les frustules vides étaient restés piégés au sein de la matrice périphytique. Des espèces représentatives des conditions du

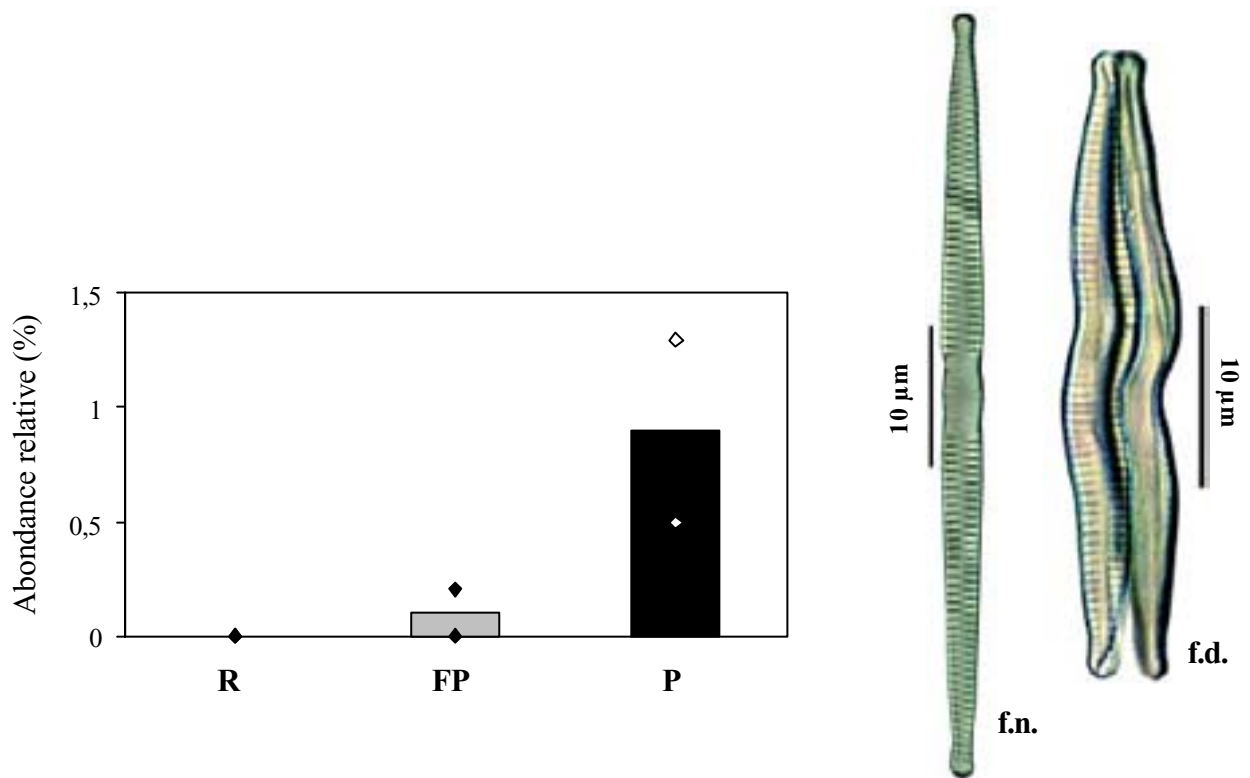


Figure 42 : Abondances relatives (valeurs moyennes et répétitions, n=2) des frustules déformés de l'espèce *Fragilaria capucina* var. *gracilis* au sein des communautés de diatomées naturelles, au niveau des trois stations retenues le long du gradient de pollution polymétallique : stations "référence" (R), "faiblement polluée" (FP) et "polluée" (P), et photographies de frustules normaux (f.n.) et déformés (f.d.) de cette espèce, d'après des observations au microscope photonique.

milieu au moment de l'expérience ont également pu être bien représentées au sein des communautés naturelles, mais ne pas avoir atteint une croissance importante sur les substrats artificiels après seulement quatre semaines de colonisation, en raison de leur long délai de développement (espèces "colonisatrices tardives"). Notons également que des proliférations plus importantes de *M. varians* et *N. dissipata* ont été observées au niveau des substrats artificiels, par rapport aux substrats naturels, sur les stations R et FP (**Figure 41**), entraînant une réduction marquée de la diversité spécifique (**Figure 40**). Ce développement supérieur des espèces constitutives des couches externes du biofilm, observé au sein des canaux expérimentaux, peut être lié aux plus faibles valeurs de courant établies dans ces systèmes. Plusieurs auteurs ont en effet démontré que les communautés périphytiques atteignaient des épaisseurs plus importantes lorsque la vitesse du courant diminuait, les biofilms étant moins exposés aux effets érosifs du courant (Luttenton and Rada 1986, Robinson and Rushforth 1987, Ghosh and Gaur 1998).

C-2.2. Le long du gradient de pollution, la mise en évidence de différences structurales comparables avec les deux types de communautés, démontrant le rôle mineur du courant au niveau des communautés naturelles

L'analyse comparative de la structure des communautés naturelles le long du gradient de pollution a révélé des différences entre les stations d'étude équivalentes à celles mises en évidence au moyen des canaux expérimentaux. En effet, au niveau des substrats naturels du lit des cours d'eau et des substrats artificiels des canaux, les communautés de diatomées ont été caractérisées par la forte prédominance des espèces *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata* sur les stations R et FP, alors que les communautés de la station P ont présenté un développement plus important de sept à huit autres espèces.

Rappelons que l'utilisation des canaux expérimentaux a permis de réduire entre les stations d'étude les variations naturelles des facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la structure des communautés périphytiques et de masquer les effets réels des métaux (nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion, vitesse du courant et conditions lumineuses homogénéisées). La similarité globale des résultats obtenus en conditions semi-contrôlées, dans les canaux, et en conditions non contrôlées, au niveau des communautés naturelles, démontre que les variations naturelles de vitesse de courant, de nature des substrats

de colonisation et d'éclairement qui ont pu exister entre les stations d'étude n'ont influencé que de façon mineure la structure des communautés périphytiques naturelles. Elles ne sont donc pas les principales causes des grandes différences structurales observées le long du gradient de pollution.

**D- EVOLUTION STRUCTURALE
DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES
DANS LES CANAUX EXPERIMENTAUX "TRANSFERES"
ENTRE DIFFERENTS POINTS DU GRADIENT DE POLLUTION :
évaluation en conditions semi-contrôlées des effets de la pollution
métallique sur des communautés exposées aux métaux
à un stade plus avancé de développement**

Une deuxième étude a été réalisée au moyen de canaux expérimentaux, basée sur le transfert vers les stations polluées (FP ou P) de communautés développées sur la station "référence" (R), afin d'évaluer en conditions semi-contrôlées les effets de la pollution métallique sur des communautés de diatomées exposées aux métaux à une phase relativement tardive de leur développement.

Le protocole expérimental de cette étude ayant été décrit précédemment¹, ainsi que les résultats des analyses physico-chimiques effectuées au niveau des trois stations², seuls les résultats concernant l'analyse structurale des communautés de diatomées seront présentés dans les paragraphes suivants.

La structure des communautés prélevées dans les canaux expérimentaux de cette deuxième étude, après deux semaines de colonisation sur la station "référence" (communautés "à transférer") puis deux et trois semaines après leur transfert vers les stations polluées (communautés "transférées"), sera comparée à celle des communautés "résidentes" de chaque station, observées lors de notre première étude.

¹ cf. Partie III-A.

² cf. Partie III-B.

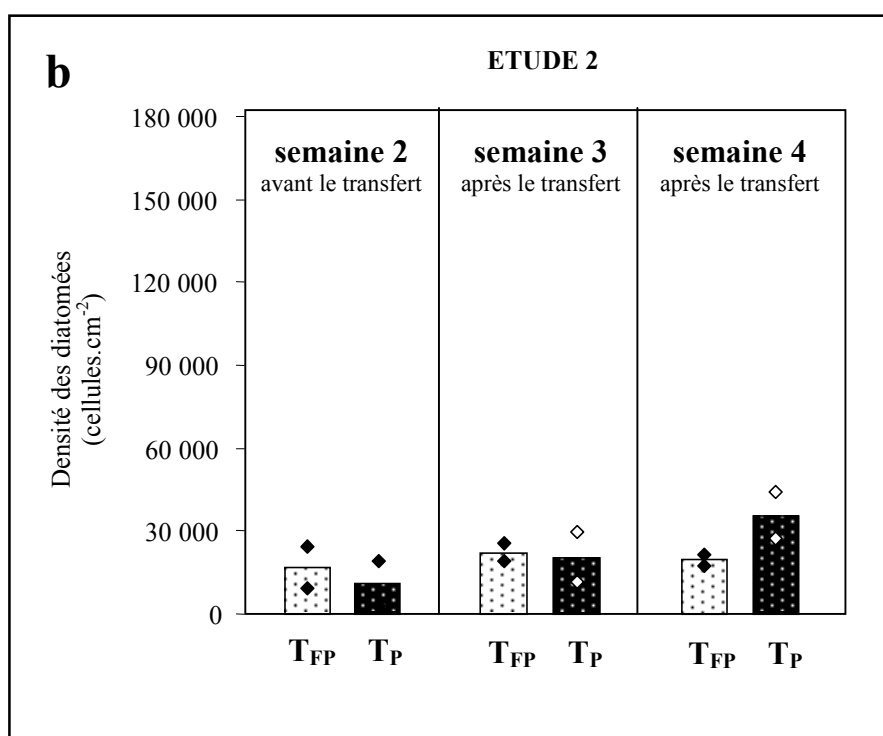
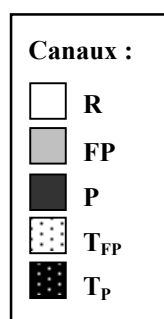
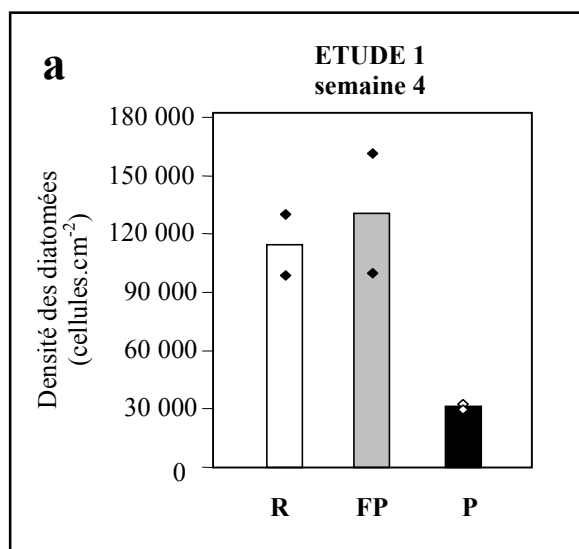


Figure 43 : Densités des diatomées (valeurs moyennes et répétitions, n=2) sur les substrats artificiels :
(a) dans les canaux expérimentaux de la première étude, après 4 semaines de colonisation sur les stations "référence" (R), "faiblement polluée" (FP) et "polluée" (P),
(b) dans les canaux de la deuxième étude, juste avant le transfert (après deux semaines sur la station "référence"), puis 1 et 2 semaines après le transfert vers les stations "faiblement polluée" (T_{FP}) ou "polluée" (T_P) (semaines 3 et 4).

D-1. RESULTATS

D-1.1. Analyse quantitative et qualitative globale des communautés de diatomées

La **Figure 43** présente les densités de diatomées observées sur les substrats artificiels, dans les canaux expérimentaux des deux études.

Après deux semaines de colonisation sur la station R (semaine 2, **Figure 43 b**), les communautés "à transférer" ont présenté des densités moyennes inférieures à 20 000 cellules.cm⁻², comparables ($P > 0,05$) à celles des communautés "résidentes" de la station R prélevées au même moment (**Figure 36**, week 2).

Après le transfert vers les stations polluées (FP et P), la densité des communautés "transférées" n'a pas varié de façon significative (**Figure 43 b**), les valeurs moyennes ne dépassant pas 30 000 cellules.cm⁻² jusqu'à la fin de l'expérience, alors qu'une croissance très prononcée a été observée au niveau des communautés "résidentes" des stations R et FP, avec des densités atteignant environ 120 000 cellules.cm⁻² après quatre semaines de colonisation (**Figure 43 a**). Les communautés "transférées" vers les stations FP et P ont donc présenté une inhibition de croissance comparable à celle observée au niveau des communautés "résidentes" de la station P, dont les densités moyennes sont restées inférieures à 30 000 cellules.cm⁻² après quatre semaines de colonisation (**Figure 43 a**).

La **Figure 44** présente la richesse spécifique et la diversité des communautés de diatomées prélevées dans les canaux expérimentaux des deux études.

Aucune différence significative de richesse spécifique n'a été observée entre les communautés "résidentes" des trois stations (R, FP, P), après quatre semaines de colonisation (**Figure 44 a**), et aucune différence significative n'est apparue non plus au niveau des communautés de la deuxième étude, entre les différents temps de prélèvement (avant et après le transfert) et entre les différents canaux (T_{FP} et T_P) (**Figure 44 b**).

En ce qui concerne la diversité, les communautés "résidentes" ont présenté des valeurs augmentant significativement avec le niveau de pollution entre les stations R, FP et P, après quatre semaines de colonisation (**Figure 44 a**). Au niveau des communautés "transférées", les valeurs moyennes de diversité ont diminué progressivement après le transfert vers la station FP (T_{FP}, **Figure 44 b**), mais cette décroissance n'est pas significative d'après les résultats de

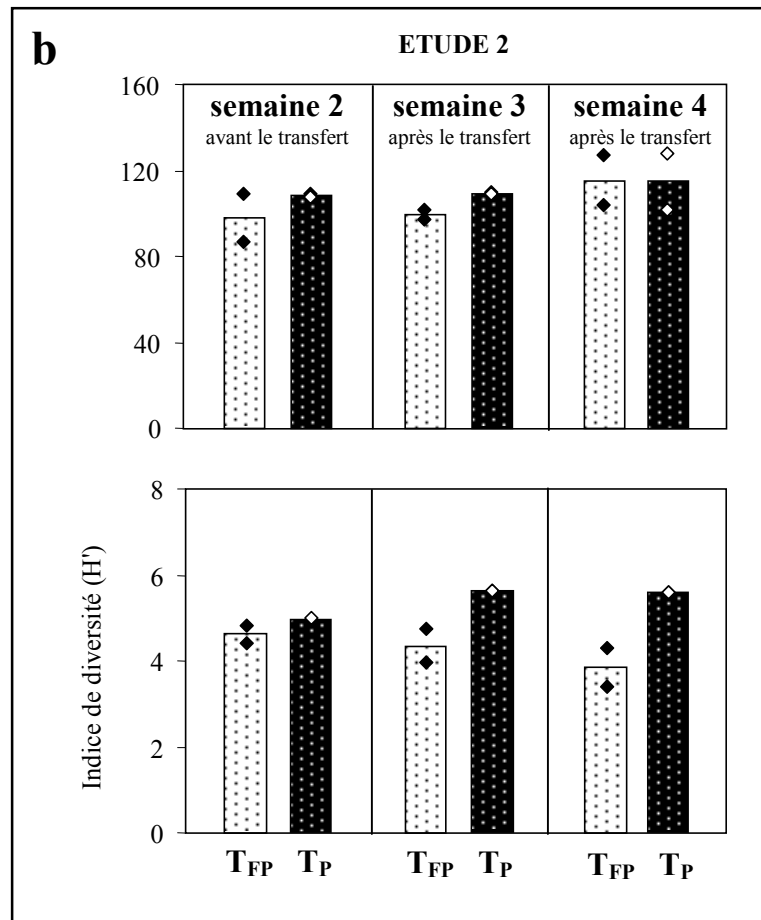
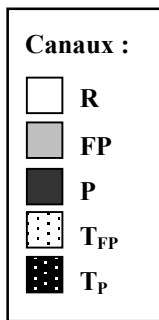
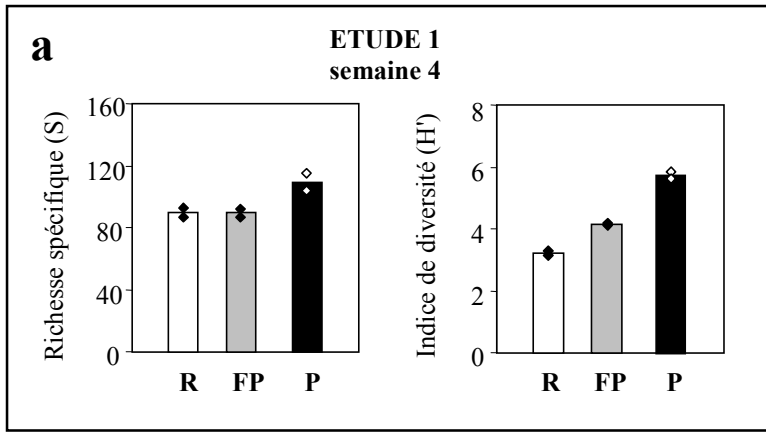


Figure 44 : Richesse spécifique (S) et indice de diversité (H') (valeurs moyennes et répétitions, n=2) des communautés de diatomées collectées sur les substrats artificiels :

(a) dans les canaux expérimentaux de la première étude, après 4 semaines de colonisation sur les stations "référence" (R), "faiblement polluée" (FP) et "polluée" (P),

(b) dans les canaux de la deuxième étude, juste avant le transfert (après deux semaines sur la station "référence"), puis 1 et 2 semaines après le transfert vers les stations "faiblement polluée" (T_{FP}) ou "polluée" (T_P) (semaines 3 et 4).

l'ANOVA. En revanche, une augmentation significative de la diversité a été observée après le transfert vers la station P, dès la première semaine suivant ce transfert (T_P semaine 3, **Figure 44 b**). A la fin de l'expérience (semaine 4), les communautés "transférées" vers la station P ont présenté une diversité significativement supérieure à celle des communautés "transférées" vers la station FP et des communautés "résidentes" de la station R.

D-1.2. Composition spécifique des communautés de diatomées

La **Figure 45** présente les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) effectuée à partir des abondances relatives des espèces au sein des communautés de diatomées :

(i) prélevées dans les canaux expérimentaux de la première étude, après deux et quatre semaines de colonisation sur chaque station (R, FP et P) (communautés "résidentes") ;

(ii) prélevées dans les canaux de la deuxième étude (T_{FP} et T_P), après deux semaines de colonisation sur la station "référence" (semaine 2 de l'expérience) (communautés "à transférer"), puis deux et trois semaines après le transfert vers les stations polluées (FP ou P) (semaines 3 et 4) (communautés "transférées").

Seules les 55 espèces qui ont présenté les plus fortes valeurs lors du cumul de leurs abondances relatives au sein de toutes les communautés, ont été prises en compte. Les axes 1 et 2 représentent respectivement environ 22,5 % et 11 % de la variation totale.

L'ACP révèle une séparation globale des communautés "résidentes" suivant leur niveau de pollution [R, FP, P], et une évolution de leur composition spécifique entre les semaines 2 et 4 de l'expérience, qui conduit à accentuer leur séparation (**Figure 45 a**). En effet, toutes les communautés "résidentes" présentent globalement sur l'axe 1 des projections proches de l'origine à la fin de la deuxième semaine [R(2), FP(2), P(2)]. Les communautés des stations R et FP se décalent ensuite nettement vers la droite de l'axe [R(4), FP(4)], alors que celles de la station P se décalent vers la gauche [P(4)]. De telles différences entre les communautés "résidentes" avaient déjà été révélées par l'ACP effectuée au moment du traitement des résultats de la première étude (**Figure 38**).

La séparation entre les communautés "résidentes" est principalement liée aux espèces *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata*, qui ont présenté des abondances relatives supérieures sur les stations R et FP, et croissant avec le temps de colonisation entre les semaines 2 et 4,

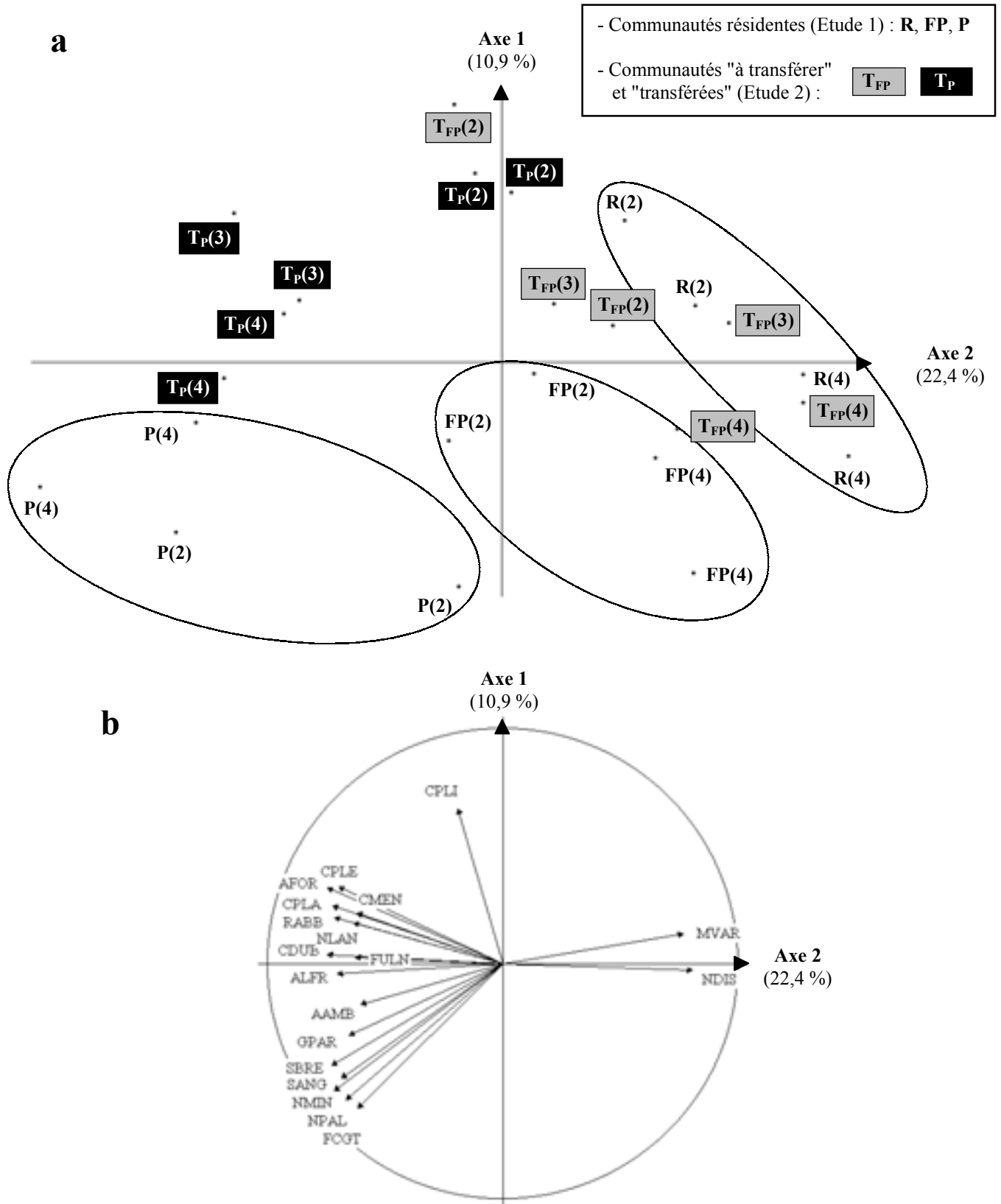


Figure 45 : Analyse en composantes principales (ACP) basée sur les abondances relatives des espèces au sein des communautés de diatomées collectées dans les canaux expérimentaux.

(a) Projection des communautés sur les deux premiers axes principaux (2 répétitions par canaux). Le temps de colonisation est indiqué entre parenthèses (2, 3 et 4 semaines). Pour plus de détails, voir dans le texte.

(b) Projection des espèces sur le cercle de corrélation. Seules les 19 espèces présentant un poids $> 0,60$ pour un des deux axes sont figurées sur le graphique.

(AAMB : *Aulacoseira ambigua*, AFOR : *Asterionella formosa*, ALFR : *Achnanthes lanceolata ssp. frequentissima*, CDUB : *Cyclostephanos dubius*, CMEN : *Cyclotella meneghiniana*, CPLE : *Cocconeis placentula var. euglypta*, CPLA : *C. placentula*, CPLI : *C. placentula var. lineata*, FCGT : *Fragilaria capucina var. gracilis fo. teratogene*, FULN : *F. ulna*, GPAR : *Gomphonema parvulum*, MVAR : *Melosira varians*, NDIS : *Nitzschia dissipata*, NLAN : *Navicula lanceolata*, NMIN : *Navicula minima*, NPAL : *Nitzschia palea*, RABB : *Rhoicosphenia abbreviata*, SANG : *Surirella angusta*, SBRE : *S. brebissonii*).

alors que les communautés de la station P ont été caractérisées par de plus fortes abondances relatives pour 16 autres espèces (**Figure 45 b**). Parmi celles-ci, une grande partie était déjà à l'origine de la séparation entre les communautés de la station P et celles des stations R et FP, dans l'ACP de la première étude (**Figure 38**), notamment la forme déformée de l'espèce *Fragilaria capucina var. gracilis*, appelée *Fragilaria capucina var. gracilis fo. teratogene* (FCGT).

Les communautés "à transférer", prélevées après deux semaines de colonisation sur la station R [$T_{FP(2)}$, $T_{P(2)}$], ont présenté des caractéristiques assez comparables à celles des communautés "résidentes" de la station R prélevées au même moment [$R(2)$] (**Figure 45 a**). Elles étaient dominées par deux espèces *M. varians* et *N. dissipata*, qui ont présenté chacune des abondances voisines de 20 % (semaine 2, **Figure 46 b**).

Après le transfert vers la station FP, la composition spécifique des communautés "transférées" [$T_{FP(3)}$, $T_{FP(4)}$] a présenté une évolution similaire à celle des communautés "résidentes" des stations R et FP (**Figure 45 a**). Comme le montre la **Figure 46 b**, les abondances relatives de *M. varians* et *N. dissipata* ont augmenté significativement après le transfert, ces deux espèces présentant des valeurs proches de 30 % chacune à la fin de l'expérience (T_{FP} semaine 4), similaires à celles observées au sein des communautés "résidentes" des stations R et FP (**Figure 46 a**).

En revanche, après le transfert vers la station P, l'évolution des communautés a été très différente. Une semaine après le transfert, les caractéristiques des communautés "transférées" [$T_{P(3)}$] s'étaient nettement rapprochées de celles des communautés "résidentes" de la station P [$P(2)$, $P(4)$], et cette évolution était encore plus marquée deux semaines après le transfert [$T_{P(4)}$] (**Figure 45 a**). La composition spécifique des communautés "transférées" était alors très différente de celle des communautés "résidentes" de la station R [$R(4)$]. Comme le montre la **Figure 46 b**, les abondances relatives de *M. varians* et *N. dissipata* n'ont pas augmenté après le transfert vers la station P (T_P), *N. dissipata* présentant même des abondances significativement inférieures à celles observées avant le transfert. En revanche, deux nouvelles espèces ont présenté des abondances supérieures à 3 % au sein des communautés "transférées" : *Navicula minima* et *Achnantheidium minutissimum*, qui faisaient également partie des espèces majeures (> 3 %) au sein des communautés "résidentes" de la station P (**Figure 46 a**).

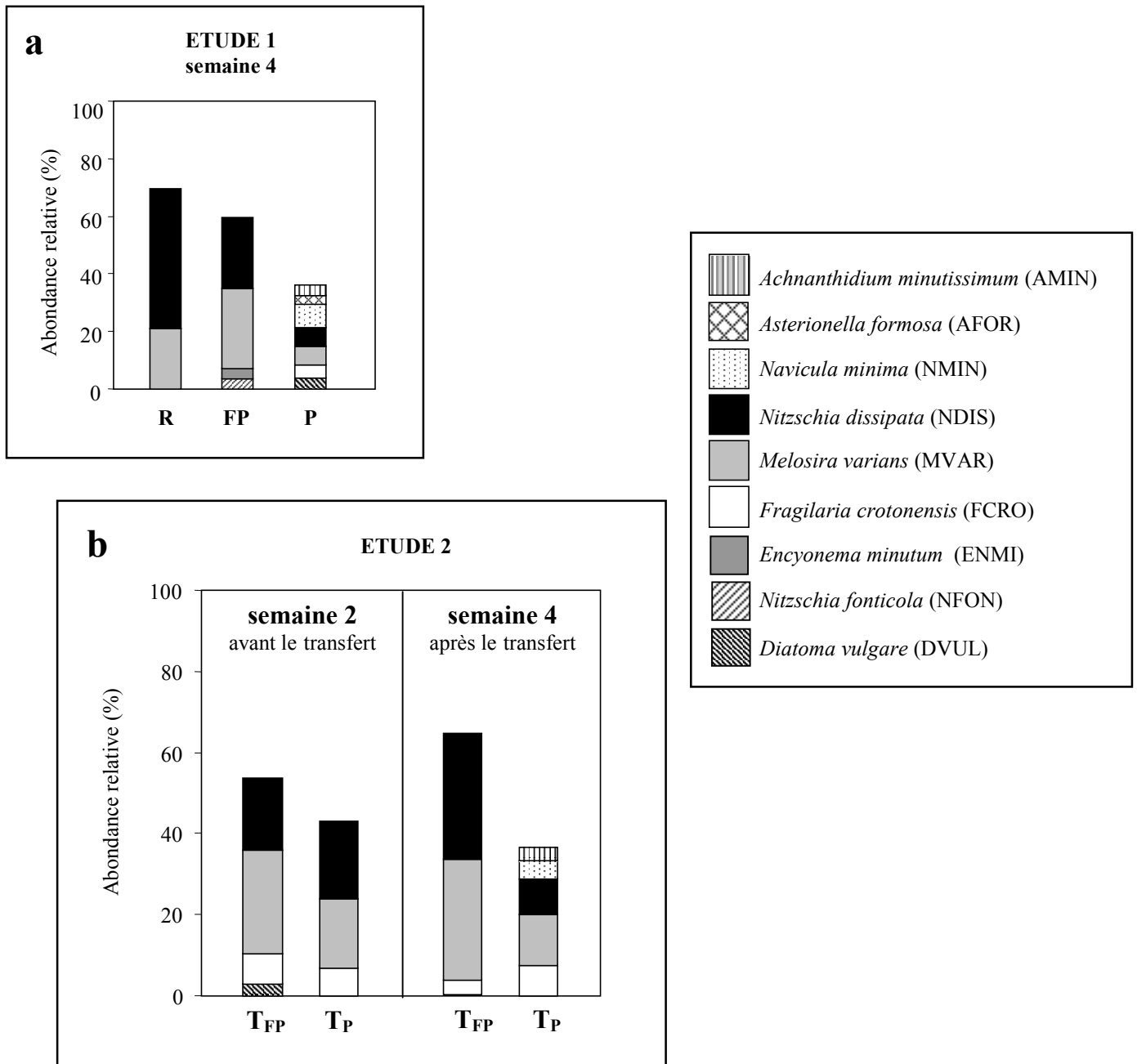


Figure 46 : Abondances relatives (valeurs moyennes, n=2) des espèces majeures (> 3 %) au sein des communautés de diatomées collectées sur les substrats artificiels :
(a) dans les canaux expérimentaux de la première étude, après 4 semaines de colonisation sur les stations "référence" (R), "faiblement polluée" (FP) et "polluée" (P),
(b) dans les canaux de la deuxième étude, juste avant le transfert (après deux semaines sur la station "référence"), et 2 semaines après le transfert vers les stations "faiblement polluée" (T_{FP}) ou "polluée" (T_P) (semaine 4).

D-2. DISCUSSION

D-2.1. Des communautés "transférées" à un stade encore précoce de leur développement

Au moment du transfert, après deux semaines de colonisation sur la station "référence" (R), les communautés de diatomées ont présenté un développement significatif sur les substrats artificiels insérés dans les canaux, avec des densités moyennes proches de 15 000 cellules.cm⁻² (**Figure 43 b**) et une composition spécifique caractérisée par la prédominance des deux espèces *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata* (**Figure 46 b**). Cependant, ces communautés n'avaient pas encore atteint leur stade de maturité. Une évolution très importante a en effet été observée entre la deuxième et la quatrième semaine de colonisation sur la station R, dans les canaux de la première étude, conduisant à des densités moyennes de 120 000 cellules.cm⁻² (**Figure 36**). Cette croissance s'est accompagnée de l'augmentation de la prédominance de *M. varians* et *N. dissipata* au sein des communautés (**Figure 39**), qui traduit un grand développement en épaisseur du biofilm.

Notre étude permet donc d'évaluer les effets de la pollution métallique sur des communautés de diatomées présentant un développement significatif sur les substrats, mais qui sont encore très éloignées de leur stade de maturité.

D-2.2. Sur la station "polluée", une évolution rapide de la structure des communautés "transférées" vers celle des communautés "résidentes"

Le transfert de communautés de la station "référence" (R) vers la station "polluée" (P) a entraîné une évolution très différente de celle observée sur la station R. La densité des diatomées n'a pas présenté de croissance significative, les valeurs ne dépassant pas 30 000 cellules.cm⁻² (**Figure 43 b**). Les communautés sont restées très fines et adhérentes sur les substrats, en raison de l'inhibition du développement de *M. varians* et *N. dissipata* (**Figure 46 b**). Les abondances relatives d'autres espèces (*Navicula minima* et *Achnanthydium minutissimum*) ont augmenté significativement au sein des communautés dès la première semaine suivant le transfert, entraînant un accroissement de la diversité (**Figure 44 b**).

Après le transfert de la station R vers la station P, la structure globale des communautés a donc évolué rapidement vers celle des communautés "résidentes" de la station P. Cette modification du développement pourrait être liée aux effets de la pollution métallique, comme nous l'avons évoqué pour expliquer les différences structurales observées entre les communautés "résidentes" des stations R et P. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté dans des conditions contrôlées des perturbations comparables de l'architecture des biofilms en présence de polluants métalliques, avec l'inhibition du développement des espèces formant la couche supérieure du biofilm, comme *M. varians*, et l'accroissement relatif des espèces adhérentes au substrat, comme *A. minutissimum* (Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a).

D-2.3. Sur la station "faiblement polluée", une croissance plus importante des communautés "résidentes" par rapport aux communautés "transférées", qui pourrait être liée à des mécanismes d'adaptation à long-terme

Dans le cas du transfert vers la station "faiblement polluée", la composition spécifique des communautés "transférées" a présenté une évolution comparable à celle des communautés restées sur la station R, qui était similaire à celle des communautés "résidentes" de la station FP. Les abondances relatives de *M. varians* et *N. dissipata* ont augmenté après le transfert, et la prédominance de ces deux espèces s'est accrue au sein des communautés (**Figure 46 b**). Cependant, les communautés "transférées" n'ont pas présenté la croissance très importante observée sur la station R et sont restées très fines et adhérentes sur les substrats, les densités ne dépassant pas 30 000 cellules.cm⁻² après l'arrivée sur la station FP (**Figure 43 b**).

Le transfert depuis la station R vers la station FP a donc provoqué une inhibition très marquée de la croissance globale des communautés de diatomées. Pourtant, les niveaux de pollution métallique étaient relativement faibles sur la station FP, avec des concentrations en Cd et en Zn dans la colonne d'eau inférieures aux limites établies pour la protection de la vie aquatique (2 µg Cd.L⁻¹ et 190 µg Zn.L⁻¹) (U.S. E.P.A. 2001) (**Table 2**). De plus, les communautés "résidentes" de cette station ont présenté une croissance comparable à celle observée sur la station R, d'après les résultats de notre première étude (**Figure 36**).

Cette différence de comportement sur la station FP entre les communautés "transférées" et les communautés "résidentes" pourrait être liée aux mécanismes d'adaptation

à long-terme aux métaux. En effet, bien que les communautés des stations R et FP soient composées des même espèces de diatomées, les souches de la station FP semblent présenter une meilleure tolérance aux métaux que celles de la station R, dont la croissance a été fortement inhibée après le transfert vers la station FP. Au niveau cellulaire, les métaux peuvent agir sur les systèmes enzymatiques et perturber les fonctions biochimiques et physiologiques de l'algue, comme la reproduction (Rai *et al.* 1981, Genter 1996). Ainsi, les souches de la station FP, exposées depuis longtemps à la pollution, ont pu développer des mécanismes d'adaptation (diminution du nombre de sites de fixation des métaux à la surface cellulaire, inhibition de l'absorption des métaux, développement de mécanismes d'exclusion, de mécanismes de détoxification interne et de sites de stockage), par voie physiologique ou par la sélection naturelle des génotypes présentant une meilleure tolérance au sein des populations (Rai *et al.* 1981, Genter 1996). Plusieurs auteurs ont observé, lors de tests d'inhibition de la photosynthèse, une meilleure tolérance aux métaux chez des souches d'algues vertes et de diatomées provenant d'environnements pollués par les métaux, par rapport à des souches de la même espèce provenant de sites non pollués (Jensen and Rystad 1974, Harding and Whitton 1976, Say *et al.* 1977, Foster 1982, Wang 1986, Takamura *et al.* 1989, Jin *et al.* 1996, Ivorra *et al.* 2000 b).

E- CONCLUSION

E-1. CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

Les nombreuses analyses des **concentrations en Cd et en Zn** dans la colonne d'eau effectuées durant nos expériences ont confirmé l'existence d'un gradient de pollution entre les trois stations d'étude, et révèlent des niveaux de contamination relativement faibles sur les stations polluées. En effet, des concentrations moyennes en métaux inférieures aux limites établies pour la protection de la vie aquatique ($2 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $190 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$, U.S. E.P.A. 2001) ont été mesurées sur la station "faiblement polluée" (FP) ($1,5 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $50 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$), tandis qu'elles étaient légèrement supérieures à ces limites sur la station "polluée" (P) ($6 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $400 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$) (**Table 2**). Ces concentrations sont équivalentes à celles mesurées auparavant - pendant la période 1995-1997 (Andrès 1997) - sur la station FP, mais nettement plus faibles sur la station P (facteur 1/5 en Cd et 1/2,5 en Zn).

Nos expériences permettent donc d'étudier les réponses des communautés de diatomées périphytiques à de relativement faibles niveaux de pollution métallique, rarement pris en compte. En effet, les études de terrain réalisées jusqu'à présent ont pour la plupart concerné des contaminations beaucoup plus marquées, comme les travaux de Ivorra *et al.* (1999, 2000 a) sur la rivière Dommel en Belgique ($40\text{-}300 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $600\text{-}3\ 000 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$), ou ceux de Rushforth *et al.* (1981) dans les Bassins de l'Utah aux USA ($300\text{-}500 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $5\ 000\text{-}70\ 000 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$).

La méthodologie originale que nous avons développée, basée sur l'utilisation de **canaux expérimentaux**, a permis de limiter entre les stations d'étude les variations naturelles de certains facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la structure des communautés périphytiques et de masquer les effets des métaux (vitesse du courant, nature des substrats de colonisation et conditions d'éclairement). L'analyse des communautés de diatomées et des facteurs physico-chimiques au sein des canaux a mis en évidence le **bon niveau de réplicabilité** de ces systèmes expérimentaux. La comparaison entre les communautés développées dans ces canaux et celles collectées sur des substrats naturels du lit des cours d'eau, au niveau de

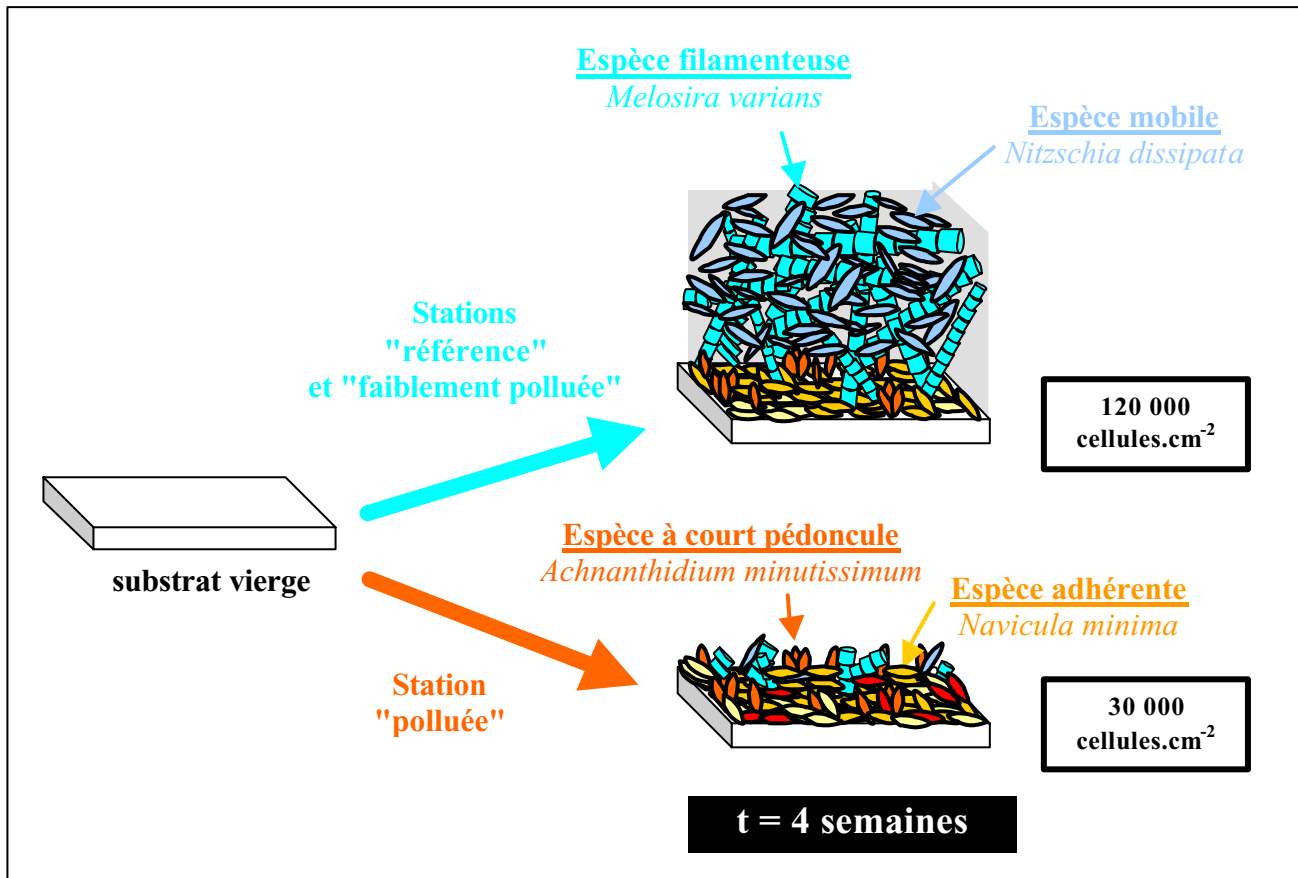


Figure 47 : Représentation schématique de l'architecture des communautés de diatomées développées sur les substrats artificiels vierges, après quatre semaines de colonisation dans des canaux expérimentaux placés le long du gradient de pollution polymétallique de la rivière Lot.

chaque station, a mis en évidence le **bon niveau de représentativité** de ces systèmes par rapport aux conditions du milieu naturel.

D'après les **analyses physico-chimiques** effectuées durant nos expériences, les stations d'étude ont présenté une grande similarité de pH, de concentration en oxygène dissous, de turbidité et d'intensité lumineuse (**Tables 2 et 3**). En revanche, la température de la colonne d'eau et les concentrations en nutriments (nitrates et sulfates) ont présenté des valeurs sur la station P plus importantes que sur les deux autres stations (**Tables 2 et 3**). Les conditions environnementales sur cette station "polluée" peuvent donc être considérées comme plus favorables au développement algal, indépendamment des concentrations en métaux dans la colonne d'eau et du niveau de pollution organique¹. Notons que des valeurs anormalement faibles de température ont été mesurées sur le Lot durant nos études (< 8°C), liées à une vague de froid précoce qui a touché la région.

E-2. HYPOTHESES CONCERNANT LES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES

E-2.1. Une réduction marquée de l'architecture en trois dimensions des communautés "résidentes", exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement

Les résultats de la première étude en conditions semi-contrôlées, qui a permis de suivre le développement des communautés de diatomées "résidentes" sur des substrats artificiels vierges au niveau des trois stations de terrain, mettent en évidence des différences très marquées de **l'architecture des biofilms** le long du gradient de pollution métallique, qui pourraient être liées aux effets de cette pollution (**Figure 47**). Sur les stations R et FP, la prolifération de l'espèce filamenteuse *Melosira varians* et de l'espèce mobile *Nitzschia dissipata* a conduit à un fort accroissement des densités et à un grand développement en épaisseur des biofilms sur les substrats, après quatre semaines de colonisation. En revanche, sur la station P, le développement des espèces constitutives des couches supérieures des

¹ cf. Partie II-A-2.2.

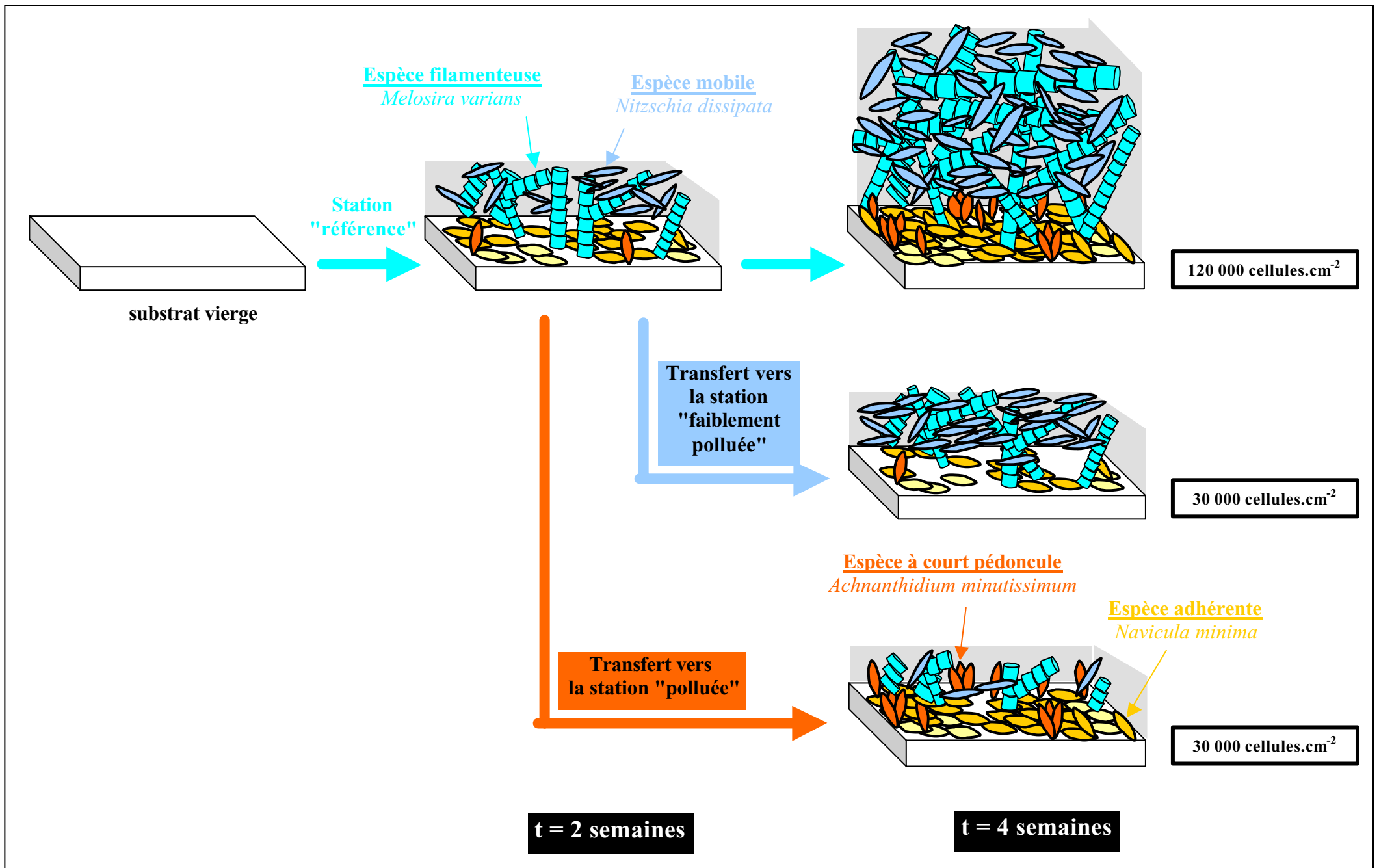


Figure 48: Représentation schématique de l'évolution des communautés de diatomées développées sur les substrats artificiels dans des canaux expérimentaux placés sur la station référence, après leur transfert le long du gradient de pollution polymétallique de la rivière Lot.

biofilms a été inhibé, ainsi que l'accroissement des densités. Les communautés sont restées très fines sur les substrats, dominées par des espèces adhérentes, comme *Navicula minima*, et des espèces étroitement rattachées au support, comme *Achnantheidium minutissimum*.

L'analyse des communautés "résidentes" le long du gradient de pollution permet également d'émettre des hypothèses sur les **niveaux de tolérance aux métaux de plusieurs espèces de diatomées**. Ainsi *M. varians* et *N. dissipata*, qui ont présenté des abondances relatives inférieures sur la station fortement polluée, pourraient être sensibles aux métaux, alors que d'autres espèces comme *Cyclostephanos dubius*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Cocconeis placentula*, *Nitzschia palea*, *Navicula minima*, *Achnantheidium minutissimum*, *Asterionella formosa*, *Gomphonema parvulum*, *Surirella angustata*, *Nitzschia linearis* ou *Pinnularia microstauron*, qui ont présenté des abondances relatives significativement supérieures sur la station polluée (**Figures 38 et 39**), peuvent être considérées comme tolérantes aux métaux.

E-2.2. Des perturbations importantes de l'évolution des communautés "transférées", exposées aux métaux à un stade de développement précoce

Les résultats de la deuxième étude en conditions semi-contrôlées, basée sur le transfert de canaux expérimentaux depuis la station "référence" (R) vers les stations polluées (FP ou P), révèlent des **perturbations importantes du développement** des communautés "transférées", visibles dès la première semaine suivant le transfert et qui pourraient être liées aux effets de la pollution métallique (**Figure 48**). La croissance globale des communautés "transférées" a été totalement inhibée, avec des densités restant faibles sur les substrats. Leur composition spécifique a rapidement évolué pour se rapprocher de celle des communautés "résidentes" de la station d'accueil (**Figure 47**), marquée par la prédominance de *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata* après le transfert vers la station FP, et de *Navicula minima* et *Achnantheidium minutissimum* après le transfert vers la station P.

La pollution métallique exercerait donc des effets importants sur des communautés en stade avancé de développement. Cependant, les communautés développées dans les canaux au moment du transfert n'ayant pas encore atteint leur stade de maturité et présentant une épaisseur relativement faible sur les substrats, notre expérience n'a pas permis d'évaluer les qualités protectrices de la matrice organique des biofilms vis-à-vis du "stress" métallique. Nos résultats permettent tout de même de supposer l'existence de **mécanismes d'adaptation à**

long-terme sur les stations polluées, les souches de la station FP présentant une croissance sur cette station plus importante que les souches des mêmes espèces originaires de la station R et "transférées" vers la station FP.

E-3. DEFINITION DES RECHERCHES SUIVANTES

Les résultats des deux études *in situ* réalisées en conditions semi-contrôlées ont permis de formuler certaines hypothèses concernant les effets de la pollution métallique sur la structure des communautés de diatomées périphytiques. Afin de compléter ces travaux, il nous a semblé intéressant de réaliser d'**autres études *in situ***, menées cette fois-ci dans les conditions naturelles de chaque site, sans contrôle des facteurs abiotiques.

Les **études en conditions non-contrôlées** représentent en effet le moyen d'estimer l'importance relative des effets supposés des métaux, mis en évidence en conditions semi-contrôlées dans les canaux de terrain, dans les conditions complexes du milieu naturel, où les variations continues de nombreux facteurs environnementaux peuvent interférer avec les effets de la pollution métallique.

Rappelons que l'analyse de **communautés naturelles**, réalisée parallèlement à nos études en canaux expérimentaux de terrain, a mis en évidence des différences structurales le long du gradient de pollution équivalentes à celles observées dans les canaux. Les variations environnementales qui ont pu exister entre les stations d'étude, et qui avaient été contrôlées au sein des canaux (vitesse du courant, nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats et conditions lumineuses homogénéisées entre les stations d'étude), semblent donc n'avoir eu que des effets mineurs sur la composition spécifique des communautés naturelles, et ne pas avoir masqué les effets supposés de la pollution métallique. Toutefois, l'analyse de communautés naturelles n'a permis de révéler que les effets à **long-terme** des différents facteurs environnementaux (courant, pollution métallique, etc.), les communautés échantillonnées s'étant développées pendant de grandes périodes de temps (jusqu'à plusieurs mois, depuis la dernière crue). Au cours de notre prochaine série d'études *in situ*, l'utilisation de substrats artificiels immergés directement dans les cours d'eau permettra d'évaluer les effets relatifs de ces facteurs environnementaux à **court-terme**, au cours des premières phases de développement des communautés sur des substrats vierges.

La mise en œuvre d'études en conditions non contrôlées sera également le moyen d'accroître la durée des expériences, afin d'atteindre le stade de maturité des communautés avant leur transfert et de pouvoir ainsi estimer les qualités protectrices de la matrice organique des biofilms vis-à-vis du "stress" métallique. Les études en conditions semi-contrôlées n'ont pas permis d'atteindre l'équilibre des communautés, et le prolongement de telles études ne paraît pas envisageable, l'utilisation des canaux expérimentaux nécessitant une surveillance quotidienne (risque d'arrêt de la pompe, de bouchage des tuyaux d'alimentation et d'évacuation, etc.), rendue difficile compte-tenu de l'éloignement entre le "site-atelier" et notre laboratoire (400 km). De plus, la souplesse des méthodologies non contrôlées permettra d'accroître la fiabilité de nos résultats, en augmentant le nombre de répétitions effectuées (3 au lieu de 2).

Ainsi, pour compléter les études en conditions semi-contrôlées, des études in situ en conditions non contrôlées ont été menées sur les mêmes stations d'étude, à l'automne de l'année suivante, et sont exposées dans la Partie IV de ce mémoire.

Rappelons que la réalisation d'**études en laboratoire**, menées en conditions contrôlées, reste le seul moyen de tester les hypothèses émises d'après les résultats des études *in situ*. En effet, bien que l'utilisation de canaux expérimentaux de terrain ait permis de limiter entre les stations d'étude les variations naturelles de certains facteurs susceptibles d'influencer la structure des communautés périphytiques (vitesse du courant, nature des substrats de colonisation et conditions d'éclairement), des différences environnementales significatives ont subsisté entre ces stations (température, concentrations en sels nutritifs, niveau de pollution organique) et empêchent de conclure sur les effets réels de la pollution métallique.

Des études en laboratoire ont été réalisées suite aux études in situ, avec des communautés de diatomées originaires de la station "référence", et font l'objet de la Partie V de ce mémoire.

PARTIE IV

**ETUDES *IN SITU* EN CONDITIONS NON CONTROLÉES
DES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE
SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTÉS
DE DIATOMÉES PERIPHYTIQUES**

SOMMAIRE DE LA PARTIE IV

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	83
B- TRANSFERT DE COMMUNAUTES DE DIATOMEES LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION ET COMPARAISON AVEC LES COMMUNAUTES "RESIDENTES" : évaluation en conditions non contrôlées des effets de la pollution métallique sur des communautés en stade avancé ou en phase initiale de développement ¹	85
C- COMPARAISON DES RESULTATS DE TERRAIN OBTENUS EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES ET EN CONDITIONS NON CONTROLEES	102
C-1. CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	102
C-2. HYPOTHESES CONCERNANT LES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES	103
<i>C-2.1. Des perturbations structurales importantes au niveau des communautés exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement, moins prononcées cependant sur les substrats immergés dans les cours d'eau, en raison des effets concomitants du courant</i>	<i>103</i>
<i>C-2.2. Des perturbations structurales moins importantes au niveau des communautés exposées aux métaux à maturité, qui pourraient être liées à un rôle protecteur de la matrice périphytique</i>	<i>104</i>
C-3. HYPOTHESES CONCERNANT LES NIVEAUX DE TOLERANCE AUX METAUX DE DIFFERENTES ESPECES DE DIATOMEES	105
C-4. DEFINITION DES RECHERCHES SUIVANTES	106

¹ Article accepté par *Water Research* en janvier 2002.



corde reliée
à la berge

flotteur



substrats artificiels
en verre



Figure 49 : Photographies des cages immergées au niveau de chaque station d'étude, munies de flotteurs et contenant des substrats artificiels en verre pour le développement des communautés périphytiques.

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE

Suite aux études en conditions semi-contrôlées réalisées en automne 1998 au niveau du gradient de pollution polymétallique (Cd/Zn) de la rivière Lot, une **deuxième série d'études *in situ*** a été menée sur ce site en automne 1999, en **conditions non contrôlées**.

Rappelons que la confrontation des résultats obtenus dans les canaux expérimentaux de terrain, qui ont mis en évidence des perturbations importantes de la structure des communautés de diatomées sur la station polluée, avec ceux d'études menées dans les conditions naturelles de chaque site, constitue le meilleur moyen d'estimer l'importance relative des effets supposés des métaux par rapport à ceux des autres variables environnementales.

Au cours de cette deuxième série d'études *in situ*, le nombre de répétitions effectuées est passé de deux à trois, afin d'accroître la fiabilité de nos résultats. La durée des expériences a également été augmentée (8 semaines au lieu de 4), les communautés développées sur les substrats artificiels lors des études précédentes, en canaux de terrain, n'ayant pas encore atteint leur stade de maturité au moment du transfert.

La méthodologie d'échantillonnage du périphyton a été basée sur l'utilisation de substrats artificiels en verre, immergés directement dans les cours d'eau au niveau des stations d'étude décrites précédemment¹ : station "référence" (R), station "faiblement polluée" (FP) et station "polluée" (P), qui présentent un gradient de pollution par rapport aux concentrations en cadmium (Cd) et en zinc (Zn) dans la colonne d'eau. Les substrats ont été insérés dans des cages en plastique munies de flotteurs en polystyrène et rattachées à la berge (**Figure 49**). Cette méthodologie a permis de mener nos études dans les **conditions naturelles de chaque site**, en homogénéisant uniquement entre les stations la nature des substrats de colonisation et leur profondeur d'immersion.

¹ cf. Partie II-A.2.2.

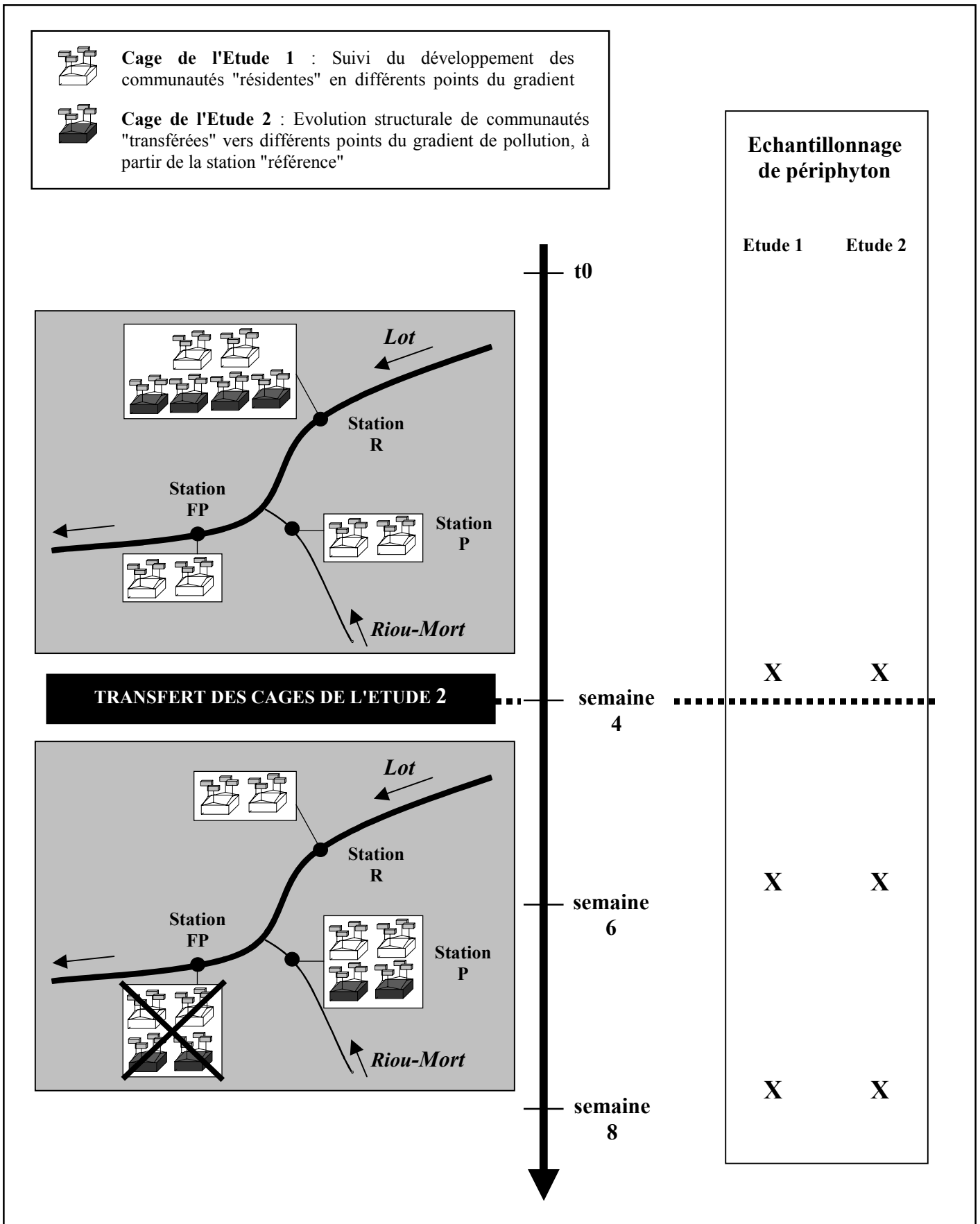


Figure 50 : Protocole des 2 études menées en parallèle en conditions non contrôlées dans la rivière Lot et le Riou-Mort (pour plus de détails, voir dans le texte).

Deux études ont été menées en parallèle, correspondant à celles réalisées au moyen des canaux expérimentaux, afin d'évaluer les effets de la pollution métallique à **différents stades du développement des communautés** de diatomées périphytiques.

La **première étude** a consisté à suivre le développement des communautés de diatomées sur des substrats artificiels vierges immergés au niveau des trois stations¹, durant huit semaines (**Figure 50**). Les résultats de cette expérience ont permis de comparer la structure des communautés "résidentes" le long du gradient de pollution métallique, et d'évaluer les effets de cette pollution sur des communautés exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement. Un lot de deux cages a été immergé au niveau de chaque station (R, FP et P) au début de l'expérience, et des échantillons de périphyton ont été collectés sur ces stations après 4, 6 et 8 semaines de colonisation (trois répétitions par temps).

La **deuxième étude** a consisté à suivre l'évolution structurale de communautés mûres originaires de la station "référence", après leur transfert vers les stations "faiblement polluée" et "polluée"¹. Un tel protocole a permis d'évaluer les effets de la pollution métallique sur des communautés exposées aux métaux à une phase plus avancée de leur développement. Deux lots supplémentaires de deux cages ont ainsi été immergés au niveau de la station "référence" (R) au début de l'expérience. A la fin de la quatrième semaine de colonisation, un de ces lots a été transféré vers la station "faiblement polluée" (FP), et l'autre vers la station "polluée" (P)¹ (**Figure 50**). Au moment du transfert, les cages ont été transportées rapidement vers la station d'accueil et immédiatement remises à l'eau (durée d'émersion des substrats artificiels inférieure à 20 minutes). Des échantillons de périphyton ont été collectés dans chaque lot de cages juste avant le transfert, sur la station R (semaine 4 de l'expérience), puis 2 et 4 semaines après le transfert vers les stations polluées (semaines 6 et 8) (trois répétitions par temps).

Comme nous l'avons précisé pour les approches réalisées précédemment *in situ*, en conditions semi-contrôlées, la première expérience révèle les effets à long-terme de la pollution métallique, sur les souches de diatomées "résidentes" des stations polluées, qui ont pu développer des mécanismes d'adaptation. En revanche, la deuxième étude permet d'évaluer les effets à court-terme, sur des communautés originaires de la station "référence", non acclimatées aux métaux et soumises à une contamination soudaine.

¹ L'ensemble des cages placées sur la station FP ayant subi des dégradations importantes durant le déroulement de nos expériences (semaine 5), seules les communautés "résidentes" des stations R et P et les communautés "transférées" de la station R vers la station P ont pu être analysées et comparées.

**B- TRANSFERT DE COMMUNAUTES DE DIATOMÉES
LE LONG DU GRADIENT DE POLLUTION
ET COMPARAISON AVEC LES COMMUNAUTES "RESIDENTES" :
évaluation en conditions non contrôlées des effets de la pollution
métallique sur des communautés en stade avancé ou
en phase initiale de développement**

*Field transfer of periphytic diatom communities
to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers¹*

Gold Caroline ^(1,2), Feurtet-Mazel Agnès ^{(1)*}, Coste Michel ⁽²⁾, Boudou Alain ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), UMR CNRS 5805, Université Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

⁽²⁾ Cemagref, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France

* Corresponding author. Tel.: + 33 (0) 5-56-22-39-20; fax: + 33 (0) 5-56-54-93-83. E-mail address: a.feurtet-mazel@ecotox.u-bordeaux.fr

SHORT TITLE

Diatom field transfer along metal pollution gradient

KEYWORDS

Periphyton - Microalgae - Diatoms - Cadmium - Zinc - Field transfer

¹ Article accepté par *Water Research* en janvier 2002.

ABSTRACT

Short-term effects of metal pollution were assessed by transferring periphytic diatom communities developed on artificial substrates from a reference site to a site polluted by heavy metals (around 15 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$ and 800 $\mu\text{g Zn.L}^{-1}$), located in neighbouring streams. Metal sensitivity of mature assemblages (aged one month) was evaluated by studying changes in diatom density and taxonomic composition two weeks and four weeks after the transfer. Resident communities of both sites were simultaneously collected on similar artificial substrates, in order to compare short-term effects of metals within transferred communities with long-term effects observed at the polluted site.

Field transfer induced a marked shift of community structure towards that of the resident community of the polluted site: diatom density rapidly decreased after the transfer, from $35,000 \pm 4,000 \text{ cells.cm}^{-2}$ to $15,000 \pm 300 \text{ cells.cm}^{-2}$ after two weeks, and taxonomic composition changed. Relative abundances of species characteristic of the reference site rapidly decreased, e.g. *Nitzschia dissipata* and *Gomphoneis minuta*, whereas species characteristic of the polluted site progressively increased within transferred communities, e.g. *Gomphonema parvulum*, *Pinnularia* sp. or *Fragilaria crotonensis*. The structure of periphytic diatom communities could therefore be an indicator of metal pollution, with marked taxonomic changes being identified within reference assemblages after only two weeks under relatively low metal exposure.

INTRODUCTION

Nowadays, great attention is given to biological monitoring to assess aquatic ecosystem health and to complete chemical and physical analyses usually performed. Aquatic organisms, that integrate all the biotic and abiotic parameters in their habitat, can provide a continuous record of environmental quality and reveal various environmental changes of natural and anthropogenic origin.

Benthic algae, diatoms in particular, possess many of the attributes required for monitoring organisms (McCormick and Cairns, 1994; Lowe and Pan, 1996): they are widely distributed, and occupy an essential position at the base of aquatic foodwebs as important primary producers in many freshwater environments; they are fixed to substrates, therefore integrating real conditions of the habitat, and respond more rapidly to environmental changes than higher level organisms, because of their short life cycle; in addition, algal assemblages are species rich, composed of some tens taxa with various environmental tolerances and preferences. They therefore constitute a system rich in information for environmental monitoring, which can be exploited through analysis of communities' structural characteristics.

Methods have already been developed to use periphytic diatom communities as biological indicators of river acidification (Ter Braak and Van Dam, 1989), organic pollution (Descy and Coste, 1991) and eutrophication (Kelly and Whitton, 1995). Metal pollution has also motivated numerous monitoring studies, which attempted to establish a relationship between diatom species composition and the level of metal contamination. Most of these studies, based on the comparison of communities growing at different sites along strong metal pollution gradients (Say, 1978; Besch *et al.*, 1972; Say and Whitton, 1980; Rushforth *et al.*, 1981; Deniseger *et al.*, 1986; Genter and Lehman, 2000; Sabater, 2000), allow the assessment of long-term effects of metals within resident communities of the polluted sites.

On the other hand, short-term effects of metals on non-acclimated communities have scarcely been studied. The organic matrix of developed biofilms is recognized as playing a protective role against metal stress (Ivorra *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2001), so information about the metal sensitivity of mature reference diatom communities is essential to validate them as indicators of metal pollution. Experiments have been conducted in outdoor (Genter *et al.*, 1987; Genter and Amyot, 1994) or indoor (Medley and Clements, 1998; Ivorra *et al.* 2000) artificial streams, colonized with non-acclimated communities and exposed to different metal levels, but environmental conditions in such protocols are not similar as those occurring in naturally

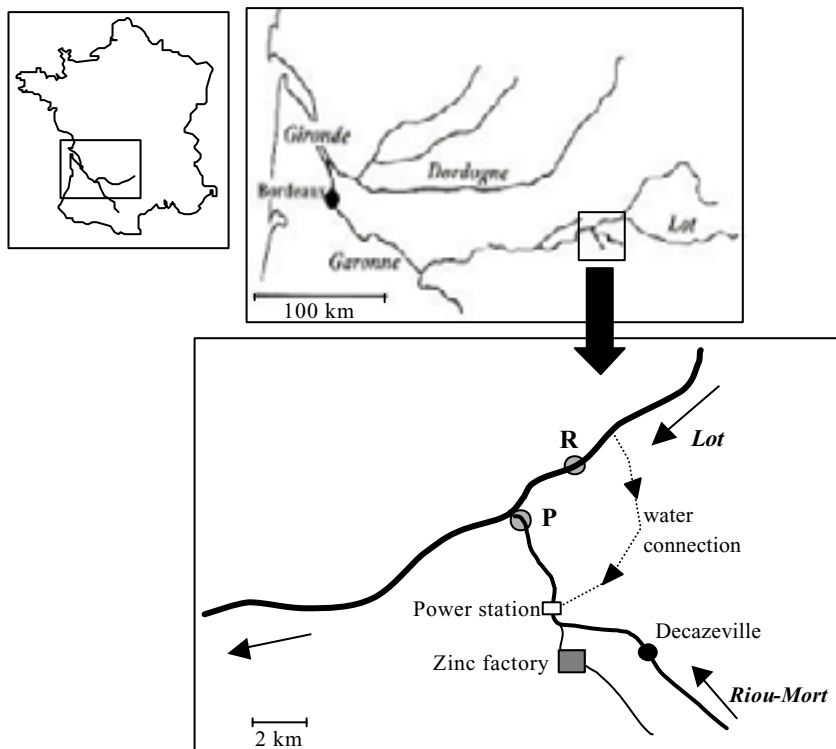


Figure 51 : Location of the two streams (Lot and Riou-Mort) and of the reference (R) and polluted (P) experimental sites.

contaminated sites. Nevertheless, field transfers of periphytic communities between differently polluted sites appeared to be a good way to assess *in situ* effects of organic or metal contamination (Iserentant and Blancke, 1984; Ivorra *et al.*, 1999).

To estimate short-term effects of metal pollution, we set-up a field transfer experiment between two sites located in neighbouring streams in the South-West of France and showing different cadmium (Cd) and zinc (Zn) pollution levels. Mature diatom assemblages (aged one month) developed on artificial substrates at the reference site were transferred to the metal-polluted site for periods of two and four weeks. This experiment presented the advantage of studying relatively low metal exposure levels, compared to the majority of previous works conducted in highly polluted areas, and of having been realized between two sites showing similar potential diatom species groups, although they were located in neighbouring streams. Metal sensitivity of reference communities was assessed by studying changes in diatom density and taxonomic composition occurring after their transfer to the polluted site. Resident communities of the reference and polluted sites were collected simultaneously on similar artificial substrates, in order to compare short-term effects of metals observed within transferred communities, after two and four weeks of metal exposure, with long-term effects observed within resident communities of the polluted site, exposed to pollution since many years.

MATERIAL AND METHODS

Study sites

The study area is located in the industrial basin of Decazeville (SW France), in the middle section of the River Lot (**Figure 51**). Since the end of the last century, the Riou-Mort, a small tributary of the Lot, has carried seepage from a former zinc factory and is responsible for metal inputs into the Lot, mainly based on Cd and Zn discharge.

Two sites presenting different metal pollution levels were selected in these streams, although they show not similar morphological and hydro-dynamical characteristics: (i) the reference (R) site, located on the Lot about 4 km upstream from the junction with the Riou-Mort, with very low metal concentrations in the water column and sediment compartments, similar to the background levels in this area (Andres *et al.*, 1999); (ii) the polluted (P) site, located directly on the Riou-Mort, just above its confluence with the River Lot.

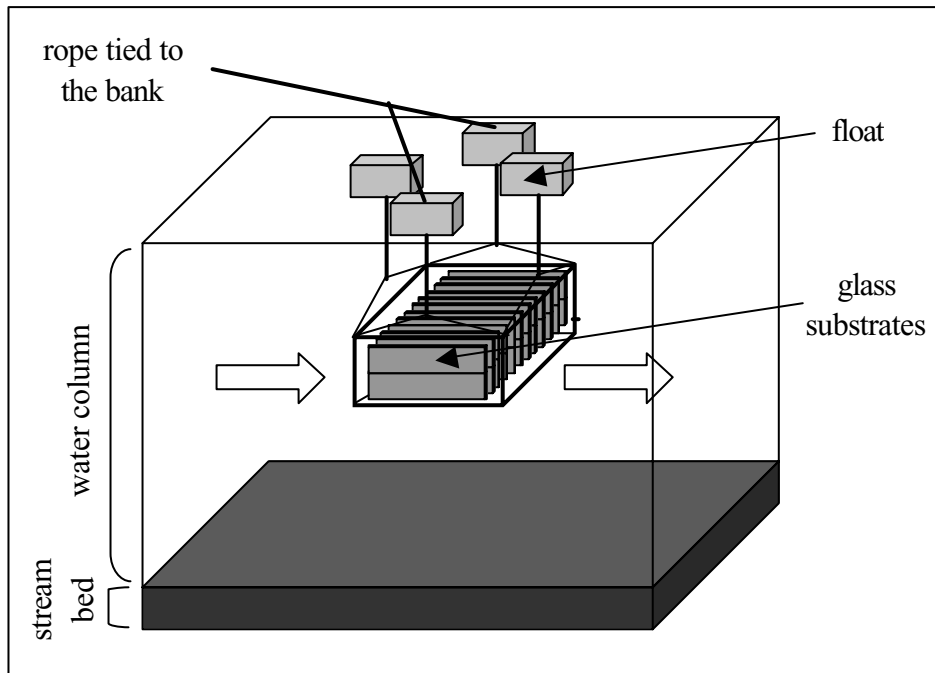


Figure 52 : Schematic representation of one of the plastic racks immersed in the water column at the two sites, equipped with floats, tied to the bank with a rope, and containing 24 glass substrates for algal attachment.

These two streams are combined, with water pumped into the Lot, upstream of the R site, to cool a power station located on the Riou-Mort, upstream of the P site. Stream microorganisms from the Lot are therefore regularly introduced into the Riou-Mort, allowing homogenization between the two sites (R and P) of the immigrating group of diatoms that can potentially colonize substrates.

Physical and chemical characteristics of sites and metal concentrations in the water

Temperature, pH, conductivity (WTW, Weilheim, Germany) and turbidity (HANNA, Woonsocket, RI, USA) were measured every two weeks in the streams, during the eight-week experimental period (October 5 - November 29 1999). Surface water velocity was estimated at each site, by means of a float and a stopwatch.

Stream water samples were simultaneously collected using clean techniques and brought back to the laboratory for nutrient and metal measurements. Phosphate, silica, ammonium and nitrate concentrations were determined according to standardized colorimetric methods (French norms nos. NF EN 1189, NF T 90007, NF EN ISO 11732 and NF EN ISO 13395, respectively) (A.F.N.O.R., 2001). Water samples for total recoverable metals (Cd and Zn) were preserved by acidification with HNO₃ (2%), and kept refrigerated. Samples for dissolved metals were filtered in the field (0.45 µm polycarbonate Cyclopore filters - Autotop WF, Polylabo) before acidification. Cd concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry (Varian AA400 – Zeeman correction, Victoria, Australia), equipped with a graphite tube atomiser (model GTA96, Varian) and autosampler, and Zn concentrations by flame atomic absorption spectrometry (Varian AA20). More details can be found in Andres *et al.* (1999).

Periphyton sampling methodology

At the two sites, plastic racks (30.5 x 38.5 x 12.5 cm) equipped with floats were immersed in the water column at a depth of 15 cm, and tied to the bank with a rope (**Figure 52**). Twenty-four artificial substrates for algal attachment (30 x 6 cm glass slides - 360 cm² surface for both sides) were inserted vertically into the racks, and positioned parallel to the current.

One set of two racks was left at the reference (R) site and another at the polluted (P) site during the eight weeks of the experimental period, to allow development of resident communities at each site. Periphyton samples were collected three times (at weeks 4, 6 and 8).

Each time, nine glass substrates were removed from the racks at the R and P sites, pooled in threes and scraped with a cutter blade to form three replicate periphyton samples per site.

An additional set of two racks was immersed at the R site at the beginning of the experiment, for a period of four weeks only, to allow development of reference communities on substrates. After this first colonization period, the racks were transferred to the P site, and left there for four extra weeks. Just before the transfer (week 4), and two weeks and four weeks after the transfer (weeks 6 and 8), three replicate periphyton samples were collected per sampling time, as described above.

All the periphyton samples were diluted to standard volume of 240 mL of 5 % formalin solution.

Analysis of diatom assemblages

Diatom density was estimated in each sample using a Nageotte counting chamber, by enumerating the total number of diatoms in 30 fields (1.25 μ L each, 0.5 mm depth), using light microscopy at 200 x magnification (photomicroscope Leica DMRB, Wetzlar, Germany). Data were reported as cells per unit area of substrate sampled (cells.cm⁻²).

Diatom species were identified at 1,000 x magnification, by examining permanent slides of cleaned diatom frustules, digested in boiling H₂O₂ (30%) and HCl (35%), and mounted on a microscope glass slide in a high refractive index medium (Naphrax, Northern Biological Supplies Ltd, UK; RI = 1.74). 400 diatom valves were identified on each slide, according to the Krammer and Lange-Bertalot classification (1986, 1988, 1991a, 1991b). Relative abundances of the species (in percentage) and species richness were estimated, and diatom diversity was calculated using the Shannon-Weaver index.

Data analyses

One way ANOVA were performed using STATISTICA Software (Version 5, 97 Edition), after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term), to detect significant differences in diatom community species richness, diversity, density and species relative abundance: (i) for each sampling time (4, 6 and 8 weeks), between transferred (T) and resident (R and P) communities; and (ii) for each community (T, R and P), between the three sampling times (4, 6 and 8 weeks). If the null hypothesis was rejected, we used Least Square Deviation test

	R site					P site				
	week 0	week 2	week 4	week 6	week 8	week 0	week 2	week 4	week 6	week 8
pH	6.9	7.6	7.7	7.2	7.2	7.5	7.5	7.8	7.6	7.1
Temperature (°C)	14.2	13.6	12.1	9.3	6.5	12.2	14.2	17.6	13.5	12.8
Conductivity ($\mu\text{S.cm}^{-2}$)	136	166	133	145	159	1164	450	466	417	372
Turbidity (FTU)	6.5	32.3	11.2	11.1	5.4	17.6	21.3	12.8	13.5	10.7
PO_4^{2-} (mg.L^{-1})	< 0.1*	< 0.1*	< 0.1*	< 0.1*	< 0.1*	0.5	0.4	0.3	0.1	0.2
NH_4^+ (mg.L^{-1})	0.03	0.03	0.04	< 0.02*	< 0.02*	0.6	0.5	0.5	0.3	0.3
NO_3^- (mg.L^{-1})	3.7	6.7	4.3	4	4	8	10	5.9	7.4	7.4
SiO_2 (mg.L^{-1})	8.7	8.3	9.7	7.4	7.1	13.5	11.5	11	7.6	9.8
Total Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	< 0.1*	0.2	< 0.1*	0.2	< 0.1*	39.2	16.2	8.1	7.6	6.5
Dissolved Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	< 0.1*	< 0.1*	< 0.1*	< 0.1*	< 0.1*	31	11.9	6.2	5	5.5
Total Zn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	< 10*	323	< 10*	< 10*	< 10*	1 510	1 204	574	376	395
Dissolved Zn ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	< 10*	< 10*	< 10*	< 10*	< 10*	1 250	842	491	304	324

Table 4 : Water physicochemical characteristics measured at the reference (R) and polluted (P) sites, during the eight weeks experimental period.

* : < detection limit

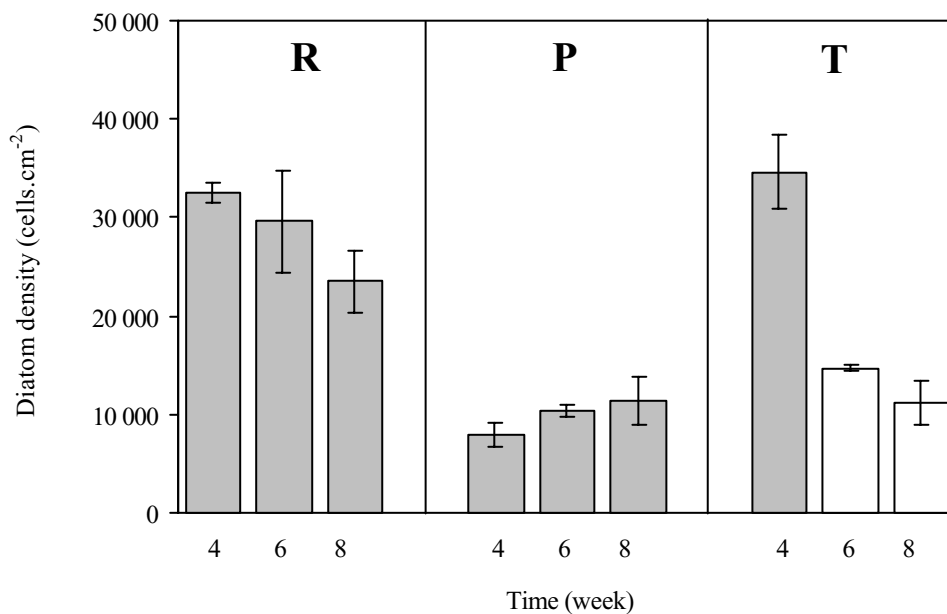


Figure 53 : Diatom densities (mean value and standard deviation, n=3) at weeks 4, 6 and 8 of the experiment, on artificial substrates (cells.cm^{-2}) remaining at the reference (R) and polluted (P) sites, and on substrates (T) to be transferred at week 4 (grey histograms). White histograms correspond to substrates collected after the transfer.

(LSD), to detect significant differences between groups. For all statistical results, a probability of $P < 0.05$ was considered significant.

A principal component analysis (PCA) was performed using SPAD Software (version 4), on data concerning relative abundances of diatom species within transferred (T) and resident (R, P) communities collected over the experiment, to reveal taxonomic differences between these communities.

RESULTS

Physical and chemical parameters and metal concentrations in the water column

Physical and chemical parameters measured in the streams are shown in **Table 4**. At both sites, pH was around 7.5 and turbidity showed the same profile, with a markedly higher value at week 2, due to strong precipitations. Water temperatures were about 13°C during the first month, then decreased to 6.5°C at the reference (R) site, but remained stable at about 13°C at the polluted (P) site. Comparable silica levels were found at both sites, but phosphate, ammonium and nitrate concentrations were lower at the R site. Estimated values of surface water velocity at the P site (around 15 cm.s⁻¹) were higher than at the R site (around 5 cm.s⁻¹).

Cd and Zn concentrations measured in the unfiltered (total metals) and filtered (dissolved metals) water samples at the reference (R) site were close to the detection limit for Cd (0.1 µg.L⁻¹), total Zn exceeding 10 µg.L⁻¹ only once (323 µg.L⁻¹ at week 2). At the polluted (P) site, higher concentrations were measured, with mean values around 15 µg.L⁻¹ and 810 µg.L⁻¹ for total Cd and Zn respectively, a major proportion of metals always being distributed in the dissolved phase (76 % of Cd and 80 % of Zn on average). A general decrease in both metals was observed over the experiment as a whole. Mean conductivity at the P site was 3.8 times higher than at the R site, and decreased during the experiment, following metal concentrations.

Global characterization of diatom communities

Diatom densities on artificial substrates (**Figure 53**) allowed the quantitative characterization of communities. At the reference (R) site, a mean density of 32,500 cells.cm⁻² was found after four weeks of colonization, whereas there were only 7,900 cells.cm⁻² at the polluted (P) site. For each site (R and P), no significant difference in density was detected between weeks 4, 6 and 8, despite a gradual decrease in the average values at the R site. The

		R	P	T
Species richness	week 4	84 (5.2)	91.8 (8)	83.7 (4.2)
	week 8	93.3 (4.6)	76 (2) *	88.7 (2.3)
Diversity	week 4	5.5 (0.04)	5.4 (0.2)	5.5 (0.05)
	week 8	5.6 (0.1)	5 (0.06) *	5.4 (0.1)

Table 5 : Species richness and diversity (mean value and standard deviation, n=3) of the resident diatom communities at the reference (R) and polluted (P) sites, and of the communities (T) to be transferred at week 4.

* : significant ($P < 0.05$) differences with other sites.

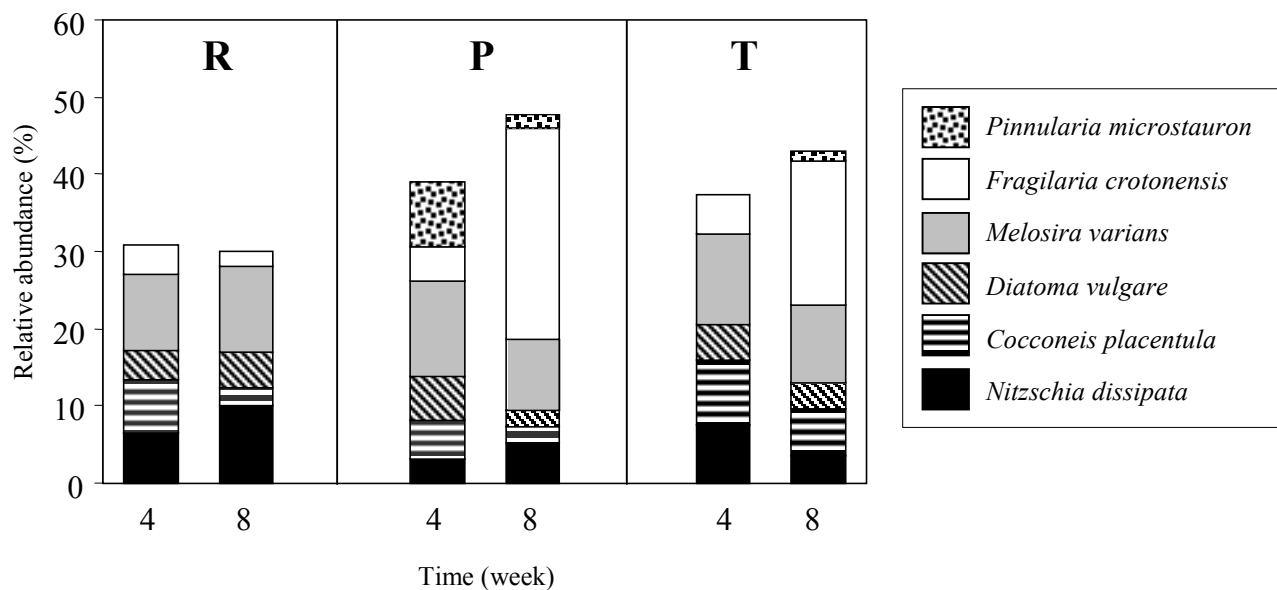


Figure 54 : Relative abundances (mean value, n=3) of the 6 main species (i.e. the species reaching a mean value $> 5\%$ in at least one of the communities considered) at weeks 4 and 8 of the experiment, within resident diatom communities of the reference (R) and polluted (P) sites, and within communities (T) to be transferred at week 4.

R communities presented significantly higher densities than the P communities (two- to fourfold).

After four weeks at the R site (week 4), densities on the substrates for transfer (T) were not significantly different from those measured in the resident communities (R). After transfer to the P site (weeks 6 and 8), densities decreased to below 15,000 cells.cm⁻² and were therefore significantly lower than in the communities remaining at the R site, but not significantly different from densities observed at the P site.

Global qualitative characterization of diatom communities was given by their species richness and diversity (**Table 5**). After four weeks of colonization, resident (R, P) diatom communities, like those to be transferred (T), showed no significantly different species richness, between 84 and 92, and diversity, around 5.5. After eight weeks, neither parameter had changed significantly in the communities remaining at the R site, likewise in transferred communities (T), whereas they decreased significantly in the resident communities at the P site, with 76 identified species and a diversity of 5.

Taxonomic composition of diatom communities

Taxonomic composition of resident (R, P) and transferred (T) diatom communities collected throughout the experiment was first assessed by the relative abundances of the six main species (i.e. the species reaching a mean relative abundance > 5% in at least one of the communities considered) (**Figure 54**). Resident communities of the R and P sites had three species in common, showing mean relative abundance > 5%: *Melosira varians*, with values (around 10 %) not significantly different between the two sites, *Cocconeis placentula*, showing a similar decrease between weeks 4 and 8 at both sites, and *Nitzschia dissipata*, which presented significantly higher proportions at the R site. At the P site, three additional species reached mean relative abundance > 5%: *Diatoma vulgare* and *Pinnularia microstauron* after four weeks, and the planctonic form *Fragilaria crotonensis* that represented 30 % of the P communities after eight weeks. After four weeks at the reference site (week 4), main species composition of the communities to be transferred (T) was similar to the resident communities (R). Four weeks after the transfer (week 8), composition had moved towards that of the polluted site (P), with relative abundances of *N. dissipata* showing a significant decrease within transferred (T) communities between weeks 4 and 8, whereas *P. microstauron* and *F. crotonensis* had significantly increased.

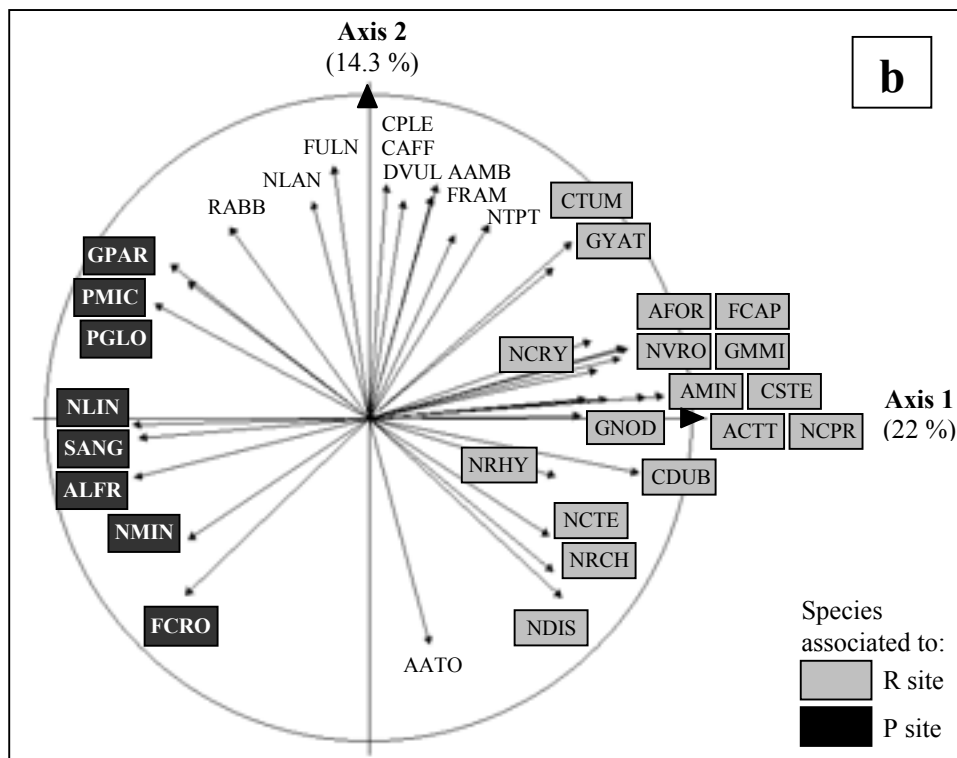
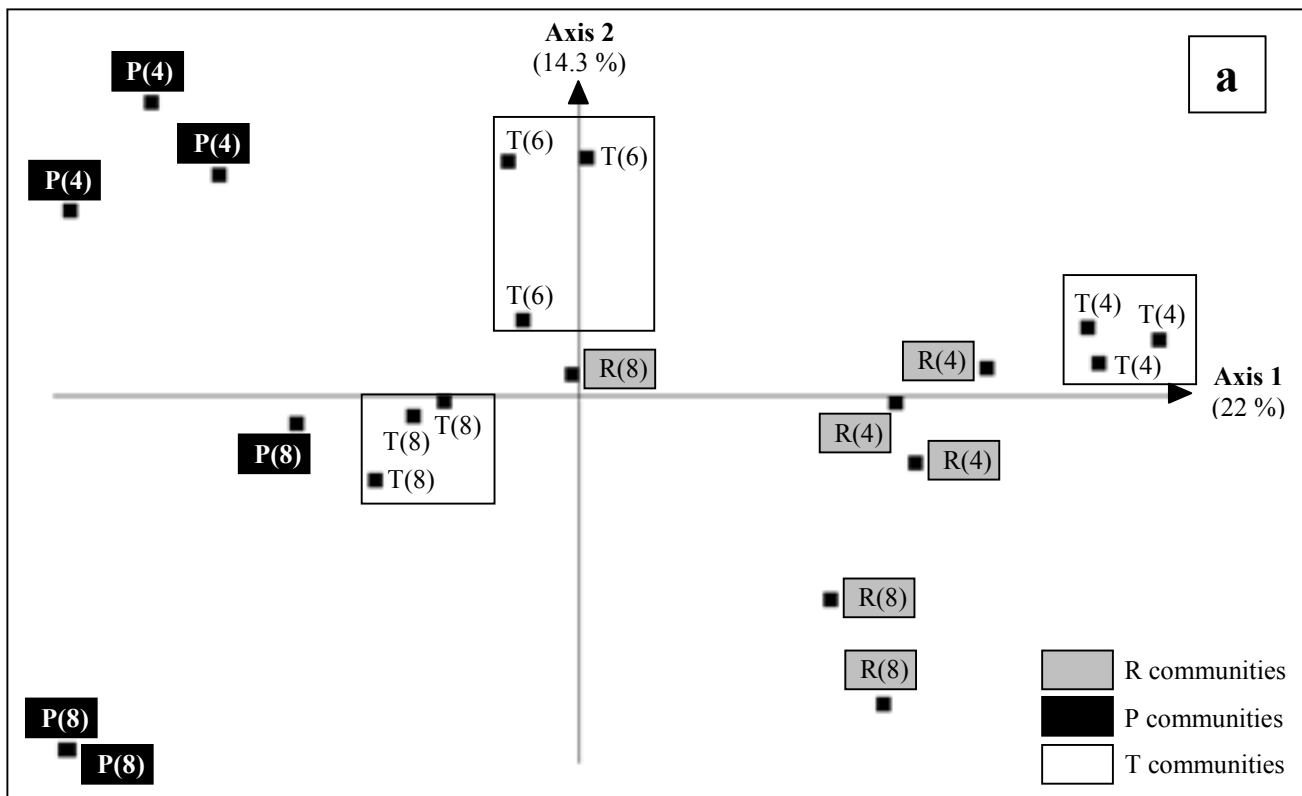


Figure 55 : PCA based on the taxonomic composition of resident (reference, R, and polluted, P) and transferred (T) diatom communities.

(a) Projection of the communities on the two first principal components axes. Sampling time is indicated in brackets (weeks 4, 6 and 8 - 3 replicates per sampling time).

(b) Projection on the correlation circle of the species with loading > 0.55 for one of the two axes.

(AAMB: *Aulacoseira ambigua*, AATO: *Achnanthes atomus*, ACTT: *A. catenata*, ALFR: *A. lanceolata ssp. frequentissima*, AMIN: *Achnantheidium minutissimum*, AFOR: *Asterionella formosa*, CAFF: *Cymbella affinis*, CTUM: *C. tumida*, CDUB: *Cyclostephanos dubius*, CPLE: *Cocconeis placentula var. euglypta*, CSTE: *Cyclotella stelligera*, DVUL: *Diatoma vulgare*, FCRO: *Fragilaria crotonensis*, FCAP: *F. capucina*, FULN: *F. ulna*, FRAM: *Frustulia rhomboides var. amphipleuroides*, GNOD: *Gyrosigma nodiferum*, GYAT: *G. attenuatum*, GMMI: *Gomphoneis minuta*, GPAR: *Gomphonema parvulum*, NCPR: *Navicula capitatoradiata*, NCRY: *N. cryptocephala*, NCTE: *N. cryptotenella*, NLAN: *N. lanceolata*, NMIN: *N. minima*, NRCH: *N. reichardtiana*, NRHY: *N. rhynchocephala*, NTPT: *N. tripunctata*, NVRO: *N. viridula var. rostellata*, NDIS: *Nitzschia dissipata*, NLIN: *N. linearis*, PGLO: *Pinnularia globiceps*, PMIC: *P. microstauron*, RABB: *Rhoicosphenia abbreviata*, SANG: *Surirella angusta*).

Taxonomic differences between resident (R, P) and transferred (T) diatom communities collected during the experiment were globally investigated using a principal component analysis (PCA), performed on the relative abundances of the 55 species with the highest cumulative abundances when all communities were considered (**Figure 55**).

PCA separated resident communities according to their colonization site (R or P), and according to their colonization duration at these sites (week 4 or 8). Axis 1 (accounting for 22 % of total variation) clearly separates resident communities at the R site (blue symbols, **Figure 55 a**), on right half plane, from those at the P site (red symbols), on left half plane. Separation along this axis results mainly from greater relative abundances at the R site of 17 species (blue symbols, **Figure 55 b**), whereas the P communities were discriminated by 8 other species (red symbols). Axis 2 (14.3 % of total variation) separates for each site (R, P) resident communities collected after four weeks, with higher axis 2 values, from those collected after eight weeks, with lower axis 2 values. Later communities (week 8) presented greater relative abundances of *Achnanthes atomus* (AATO), associated with higher proportions of *Fragilaria crotonensis* (FCRO) at the P site, and *Nitzschia dissipata* (NDIS) at the R site. Younger communities from the P site (week 4) were characterized by higher abundances of 9 other species (no symbol, **Figure 55 b**).

PCA also separated transferred communities (T) collected at the three sampling times (weeks 4, 6 and 8), revealing a progressive shift in taxonomic composition from that of the R site towards that of the P site, after the transfer. At the end of the colonization period at the reference site (week 4), communities to be transferred - T(4) - were similar to resident communities - R(4) -. Two weeks after transfer to the P site (week 6), communities presented lower axis 1 values and higher axis 2 values. Relative abundances of many of the species characteristic of the R site were then lower (blue symbols, except *Cymbella tumida* (CTUM) and *Gyrosigma attenuatum* (GYAT), **Figure 5B**), whereas proportions of 9 other species were higher (no symbol). Four weeks after transfer (week 8), communities presented lower axes 1 and 2 values, and higher relative abundances of species characteristic of the P site (red symbols), and of *A. atomus* (AATO).

DISCUSSION

Physical and chemical characteristics of sites and metal pollution levels

Numerous physical and chemical similarities were observed between the reference (R) and polluted (P) sites (**Table 4**). Turbidity and pH were comparable; water temperatures were similar during the first experimental month, but differed afterwards: winter season decrease occurred at the R site, whereas temperatures remained constant at the P site, because of the activity of the power station upstream from the sampling site (**Figure 51**). In any case, communities transferred from the R to the P site after four weeks were subjected to comparable temperatures throughout the experiment. Both sites presented similar concentrations of silica, essential diatom nutrient, but phosphate and nitrogen compounds were higher at the P site. Independently of metal concentrations in the water, higher temperatures and nutrient concentrations observed at the polluted (P) site are predicted to stimulate global algal growth (Biggs, 1996). High nutrient concentrations could also have affected metal toxicity to algal cells, but it is not clear whether it could have increased or decreased metal stress. The increase of phosphate or nitrate concentration has been demonstrated to decrease metal toxicity according to Rai *et al.* (1981). Genter (1996) has also reported that phosphate could precipitate with metals and therefore decrease their toxicity. On the other hand, Wang and Dei (2001) have observed in a coastal diatom an increase of Cd uptake with nitrate concentration, which could lead to increase metal stress. Water velocity was also different between the two sites, with values around three times higher at the P site (15 cm.s^{-1}), and could have affected the structural characteristics of periphytic diatom communities. An increase of current velocity from 0 to $10\text{-}14 \text{ cm.s}^{-1}$ has been reported to decrease the density of mature algal periphyton by Ghosh and Gaur (1998).

As expected, Cd and Zn concentrations were usually below the detection limits at the reference (R) site, whereas relatively low pollution levels were detected at the polluted (P) site. Nevertheless, concentrations of both metals at this site (around $15 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ and $800 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$) were higher than U.S. E.P.A. water quality criteria for protection of aquatic life ($< 2 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ or $190 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$) (U.S. E.P.A., 2001), but stayed relatively low compared to previous *in situ* studies, reporting more than $300 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ and $3,000 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$ (Ivorra *et al.*, 1999; Rushforth *et al.*, 1981; Sabater, 2000).

Long-term effects of metal pollution on diatom communities

Strong structural perturbations were observed within resident communities at the polluted (P) site, compared to those at the reference (R) site. Lower diatom densities were reported at the P site between weeks 4 and 8 (**Figure 53**). Diatom species richness and diversity were also lower at the P site after eight weeks (**Table 5**). Furthermore, communities of the two sites showed marked differences in taxonomic composition after four and eight weeks (**Figures 54 and 55**), although both sites present similar diatom species pools potentially able to colonize substrates.

Structural characteristics of periphytic diatom communities can be affected by physical, chemical and biological factors occurring in streams during substrate colonization. The reduction of community growth observed between the R and P sites could therefore result from all the physicochemical variations existing between the two sites, especially in current velocity, but could mainly be related to long-term effects of metal pollution at the P site. Indeed, even if increase in current - as at the P site - has been reported to reduce mature algal periphyton density (Ghosh and Gaur, 1998), growth inhibition of resident diatom communities has already been observed at the P site, when outdoor artificial streams set up on the river banks were used to standardize current velocity between sites (Gold *et al.*, submitted¹). Furthermore, many of the taxonomic differences observed between resident communities at both sites have also been reported under homogenized current velocities (Gold *et al.*, submitted¹), as higher abundances of *Gomphonema parvulum*, *Pinnularia microstauron*, *Nitzschia linearis*, *Surirella angustata*, and *Navicula minima* (red symbols, **Figure 55**) at the P site, and of *Nitzschia dissipata* (blue symbol) at the R site. The slight decrease in diatom species richness and diversity observed at the P site after eight weeks has been observed at a higher degree in areas showing greater metal pollution levels (Say, 1978; Say and Whitton, 1980; Deniseger *et al.*, 1986; Genter and Lehman, 2000; Sabater, 2000). Besides benthic diatom species, several planktonic forms were well-developed within periphytic communities at both sites, such as *Fragilaria crotonensis* that reached higher relative abundances at the P site (**Figure 54**), or *Aulacoseira ambigua*, *Asterionella formosa*, *Cyclostephanos dubius*, *Cyclotella stelligera* and *Fragilaria capucina* that showed higher relative abundances at the R site (**Figure 55**). These species, originating from reservoirs located upstream on the River Lot, constituted a fraction of the

¹ cf. Partie III-B.

group of immigrating diatoms common to both sites and were trapped in the organic matrix of periphytic biofilms.

The species that showed higher proportions within periphytic communities collected at the reference (R) site (blue symbols, **Figure 55**) could be supposed to be metal-sensitive, whereas those with higher proportions at the polluted (P) site (red symbols) could be considered as metal-tolerant. Some of the species with higher proportions at the P site have already been assessed as metal-tolerant by other authors, such as *Gomphonema parvulum* (Say, 1978; Rushforth *et al.*, 1981; Sabater, 2000), *Pinnularia* sp. (Say and Whitton, 1980; Ivorra, 1999) or *Fragilaria crotonensis* (Leland and Carter, 1984; Besch *et al.*, 1972). Different mechanisms could enable algae to tolerate chemical stress at cellular level, as for example a decrease in the number of binding sites at the cell surface, uptake inhibition, development of exclusion or internal detoxifying mechanisms, and development of safe storage sites (Rai *et al.*, 1981). Long-term exposure to metal pollution could lead to development of such mechanisms within diatom populations, physiologically or genetically, so in our study diatom strains of the P site could be hypothesized to be more tolerant to metals than strains of the same species growing at the R site. Development of tolerance in diatom species growing at sites subjected to metal pollution has been demonstrated by Takamura *et al.* (1989), using laboratory toxicity tests of algae photosynthetic activity.

In the present study, the species *Achnantheidium minutissimum* presented minor relative abundances, decreasing at the polluted site, whereas a great increase was previously reported in the Riou-Mort (Say, 1978; Gold *et al.*, submitted¹). Opinions about the response of *A. minutissimum* to metals are still contradictory, certain authors having observed decreasing abundances in polluted sites (Besch *et al.*, 1972; Rushforth *et al.*, 1981; Sabater, 2000), whereas others have reported major increases (Leland and Carter, 1984; Deniseger *et al.*, 1986; Medley and Clements, 1998; Ivorra *et al.*, 1999). We can hypothesize that *A. minutissimum* is able to develop a good resistance to metal pollution, but can be prevented from well-developing by other physical and chemical parameters independently of metal concentrations in the water column, as the high nutrient concentrations and current velocities observed at the P site in our study.

¹ cf. Partie III-B.

Short-term effects of metal pollution on diatom communities

Structural perturbations were also observed within mature reference (R) communities, after their transfer to the polluted (P) site. During the first two weeks following the transfer, high density reduction (**Figure 53**) and taxonomic composition modifications were observed (**Figures 54 and 55**). Indeed, relative abundances of species characteristic of the R site (blue symbols except *Cymbella tumida* and *Gyrosigma attenuatum*, **Figure 55 b**) decreased in transferred communities at week 6, whereas proportions of other species (no symbol) increased. These perturbations could be related to a high emigration of many of the species developed at the R site, which led to density reduction and to an increase in proportions of the species remaining after the transfer. During the third and the fourth weeks following the transfer, no more significant density change occurred, but the shift in taxonomic composition continued. Transferred communities presented higher relative abundances of species characteristic to the P site (red symbols) at week 8, which could be due to the arrival of indigenous diatoms from the reception site, and/or to high development of species already present within communities before the transfer.

Therefore, density and taxonomic composition of transferred communities changed from that of the R site to that of the P site, after the transfer. These structural changes could be mainly related to short-term effects of metal pollution. Indeed, diatom density reduction within non metal acclimated communities has been reported in laboratory streams contaminated by Cd and Zn concentrations comparable to those of the P site (Medley and Clements, 1998). Furthermore, species that declined after transfer to the P site were already supposed to be metal-sensitive when exposed to long-term contamination, whereas those that increased after transfer were considered as metal-tolerant. These results are in agreement with those of Ivorra *et al.* (1999), who reported changes in community structure to resemble that of the local communities, two weeks after transfer of reference communities to a highly polluted site, in the River Dommel subsystem, Belgium.

Our results show that structural perturbations were detected very soon within transferred communities, after only two weeks under relatively low metal exposure, although the organic matrix of mature communities has been reported to play a protective role against metal stress within laboratory streams (Ivorra *et al.*, 2000). Extracellular polymeric substances of algae and bacteria present in mature biofilms (Freeman and Lock, 1995) offer high metal complexation capacities, and therefore reduce metal bioavailability and toxicity to underlying algal cells. Metal induced taxonomical perturbations within mature reference communities were

nevertheless less pronounced than those observed within resident communities of the P site, this site being subjected to metal pollution since the end of the last century.

CONCLUSION

The results obtained from this field transfer experiment conducted between two river sites showing different cadmium (Cd) and zinc (Zn) pollution levels in order to assess short-term (after two or four weeks of metal exposure) effects of metals within non acclimated periphytic diatom communities, show that:

- 1- Field transfer of reference communities to a site with relatively low metal levels induced a marked shift in community structure towards that of the resident communities of the reception site, although the organic matrix of developed biofilms has been recognized as playing a protective role against metal stress: diatom density rapidly decreased after the transfer, and taxonomic composition changed. Proportions of species characteristic of the reference site decreased rapidly, whereas species characteristic of the polluted site increased progressively within transferred communities.
- 2- The taxonomic composition of periphytic diatom communities could be an indicator of metal pollution. Indeed, after only two weeks of exposure to relatively low metal concentrations ($15 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ and $800 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$), marked changes were identified within mature reference communities. Nevertheless, these short-term effects of metal pollution were less pronounced than long-term ones, observed within resident communities of the polluted site subjected to metal pollution since the end of the last century.
- 3- Laboratory experiments, conducted under controlled conditions (physical and chemical factors and contamination pressure), with reference diatom communities originating from the study area and exposed to different Cd and Zn levels, individually or in combinations, must be performed to confirm the short-term effects of low metal pollution reported in this paper. Although field experiments produced realistic results, variations in environmental factors are inevitable between the selected sites, and prevent conclusions being drawn on the real effect of metal pollution on benthic algal communities.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence de l'Eau Adour-Garonne, Aquitaine Région, Cemagref, within the Groupement d'Intérêt Scientifique ECOBAG. We thank Hilary Koziol, from the department of Foreign Languages (University Bordeaux 2), for improvements to the narrative style of the manuscript.

REFERENCES

- A.F.N.O.R. (2001). Web site: <http://www.afnor.fr>
- Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A. (1999). Field transportation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (11), 2462-2471.
- Besch, W.K., Ricard, M., Cantin, R. (1972). Benthic diatoms as indicators of mining pollution in the Northwest Miramichi River System, New Brunswick, Canada. *Int. Rev. Ges. Hydrobio.* 57(1), 39-74.
- Biggs, B.J.F. (1996). Patterns in benthic algae of streams. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 31-56.
- Deniseger, J., Austin, A., Lucey, W.P. (1986). Periphyton communities in a pristine mountain stream above and below metal mining operations. *Freshwater Biol.* 16, 209-218.
- Descy, J., Coste, M. (1991). A test of methods for assessing water quality based on diatoms. *Ver. Int. Verein. Theor. angewandte Limnol.* 24, 2112-2116.
- Freeman, C., Lock, M.A. (1995). The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnol. Oceanogr.* 40(2), 273-278.
- Genter, R.B. (1996). Ecotoxicology of inorganic chemical stress. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 403-468.
- Genter, R.B., Cherry, D.S., Smith, E.P., Cairns, J.Jr. (1987). Algal-periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms. *Hydrobiologia* 153, 261-275.
- Genter, R.B., Amyot, D.J. (1994). Freshwater benthic algal population and community changes due to acidity and aluminium-acid mixtures in artificial streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 13(3), 369-380.

- Genter, R.B., Lehman, R.M. (2000). Metal toxicity inferred from algal population density, heterotrophic substrate use, and fatty acid profile in a small stream. *Environ. Tox. Chem.* 19(4), 869-878.
- Ghosh, M., Gaur, J.P. (1998). Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. *Aquat. Bot.* 60, 1-10.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A. (submitted). Impacts of metals (Cd, Zn) on the development of periphytic diatom communities within outdoor artificial streams along a pollution gradient. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*
- Gray, B.R., Hill, W.R., Stewart, A.J. (2001). Effects of development time, biomass and ferromanganese oxides on nickel sorption by stream periphyton. *Environ. Pollut.* 112, 61-71.
- Iserentant, R., Blancke, D. (1984). A transplantation experiment in running water to measure the response rate of diatoms to changes in water quality. In: Ricard, M., (Eds), *Proceedings of the 8th International Diatom Symposium, Paris, 1984.* Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Tubbing, G.M.J., Kraak, M.H.S., Sabater, S., Admiraal, W. (1999). Translocation of microbenthic assemblages used for in situ analysis of metal pollution in rivers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 19-28.
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M.H.S., Admiraal, W. (2000 a). Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ. Toxic. Chem.* 19(5), 1332-1339.
- Kelly, M.G., Whitton, B.A. (1995). The trophic diatom index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *J. Appl. Phycol.* 7, 433-444.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1986). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), *Bacillariophyceae. Teil 1. Naviculaceae.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1988). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), *Bacillariophyceae. Teil 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1991a). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), *Bacillariophyceae. Teil 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H. (1991b). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), *Bacillariophyceae. Teil 4. Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Leland, H.V., Carter, J.L. (1984). Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream. *Freshwater Biol.* 14, 281-296.

- Lowe, R.L., Pan, Y. (1996). Benthic algal communities as biological monitors. In: Algal ecology of freshwater benthic ecosystems, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 705-739.
- McCormick, P.V., Cairns, J. Jr (1994). Algae as indicators of environmental change. *J. Appl. Phycol.* 6, 509-526.
- Medley, C.N., Clements, W.H. (1998). Responses of diatom communities to heavy metals in streams: the influence of longitudinal variation. *Ecological Applications* 8(3), 631-644.
- Rai, L.C., Gaur, J.P., Kumar, H.D. (1981). Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.* 56, 99-151.
- Rushforth, S.R., Brotherson, J.D., Fungladda, N., Evenson, W.E. (1981). The effect of dissolved heavy metals on attached diatoms in the Uintah Basin of Utah, U.S.A. *Hydrobiologia* 83, 313-323.
- Sabater, S. (2000). Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guardamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *J. Appl. Phycol.* 12(2), 113-124.
- Say, P.J. (1978). The Riou-Mort, a tributary to the river Lot polluted by heavy metals. I. Preliminary observations on the chemistry and benthic algae. *Annals Limnol.* 14(1-2), 113-131.
- Say, P.J., Whitton, B.A. (1980). Changes in flora down a stream showing a zinc gradient. *Hydrobiologia* 76, 255-262.
- Takamura, N., Kasai, F., Watanabe, M.M. (1989). Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J. Appl. Phycol.* 1, 39-52.
- Ter Braak, C.J.F., Van Dam, H. (1989). Inferring pH from diatoms: a comparison of old and new calibration methods. *Hydrobiologia* 178, 209-223.
- U.S. E.P.A. (2001). Water pollution legal aspects. Web site: <http://www.epa.gov>
- Wang, W.-X., Dei, R.C.H. (2001). Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). *Wat. Res.* 35(1), 315-321.

C- COMPARAISON DES RESULTATS DE TERRAIN OBTENUS EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES ET EN CONDITIONS NON CONTROLEES

C-1. CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

Les analyses des **concentrations en Cd et en Zn** dans la colonne d'eau du Lot et du Riou-Mort effectuées durant cette deuxième série d'études *in situ* ont révélé des niveaux de pollution métallique sur la station "polluée" ($12 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $650 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$ dans la phase dissoute, **Table 4**) plus importants que ceux mesurés l'année précédente ($6 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $400 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$, **Table 2**).

Rappelons que ces concentrations sont supérieures aux limites établies pour la protection de la vie aquatique ($2 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $190 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$, U.S. E.P.A. 2001), mais restent nettement inférieures aux niveaux de pollution pris en compte jusqu'à présent ($> 300 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $3\,000 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$) (Ivorra *et al.* 1999, Rushforth *et al.* 1981).

Durant cette deuxième série d'études *in situ*, la méthodologie d'échantillonnage du périphyton, basée sur l'utilisation de substrats artificiels immergés dans les cours d'eau au niveau de cages munies de flotteurs, a permis de se trouver dans les conditions naturelles de chaque site. Les valeurs de courant mesurées à la surface des cours d'eau ont présenté un gradient significatif entre la station R (5 cm.s^{-1}) et la station P (15 cm.s^{-1}), et un ordre de grandeur global nettement supérieur au courant établi dans les canaux lors de notre première série d'études de terrain (de l'ordre du cm.s^{-1}).

Les **analyses physico-chimiques** effectuées dans la colonne d'eau des stations R et P ont confirmé les observations de l'année précédente, en mettant en évidence une similarité des valeurs de pH et de turbidité entre ces stations, et une augmentation des concentrations en nutriments entre la station R et la station P (**Tables 2, 3 et 4**). En revanche, les températures de la colonne d'eau, qui présentaient l'année précédente des valeurs anormalement basses sur le Lot ($< 8^\circ\text{C}$), avec un fort gradient entre les stations R et P, ont retrouvé sur les deux stations des valeurs représentatives des conditions automnales habituelles ($12\text{-}15^\circ\text{C}$) durant les quatre premières semaines de la nouvelle expérience. Une décroissance de la température a tout de même été observée sur la station R durant le deuxième mois de l'expérience, mais les communautés transférées de la station R vers la station P à la fin du premier mois n'ont pas subi cette variation de température.

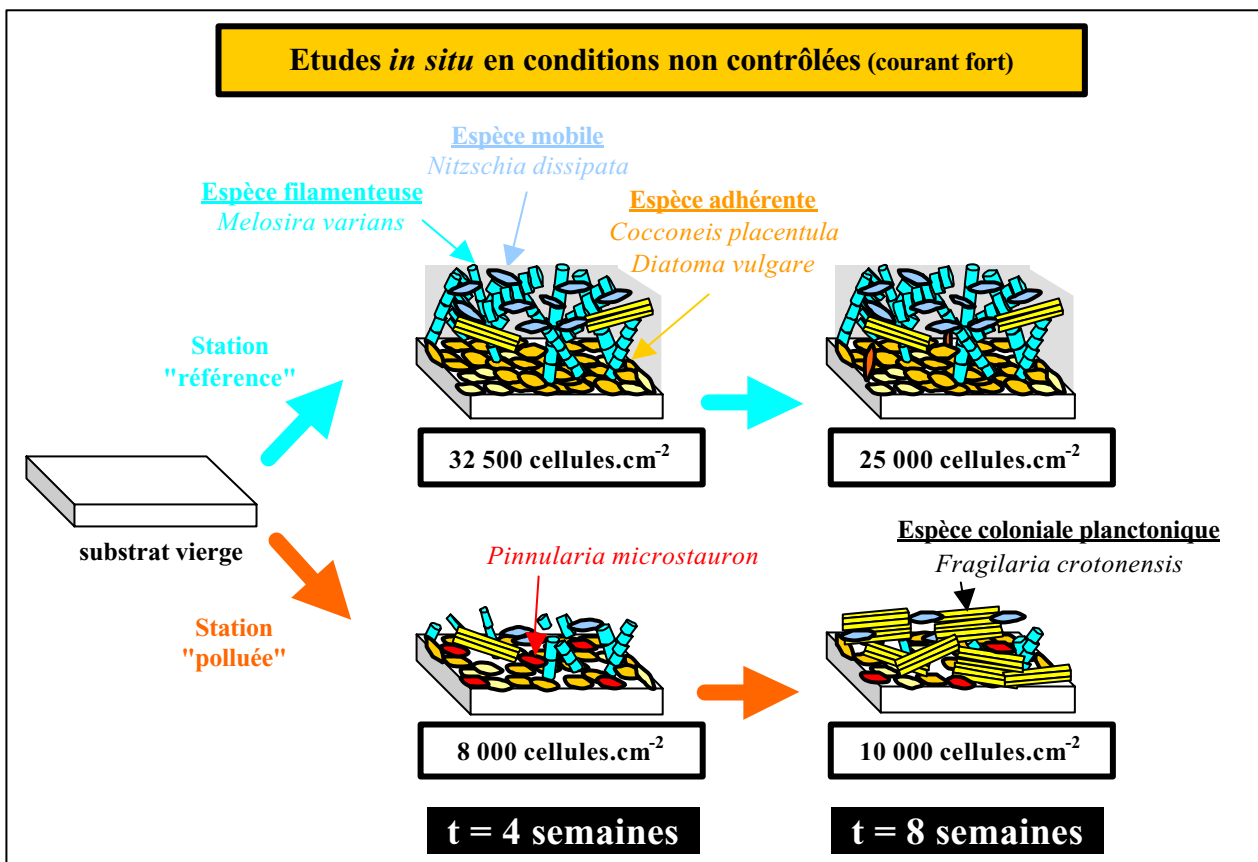
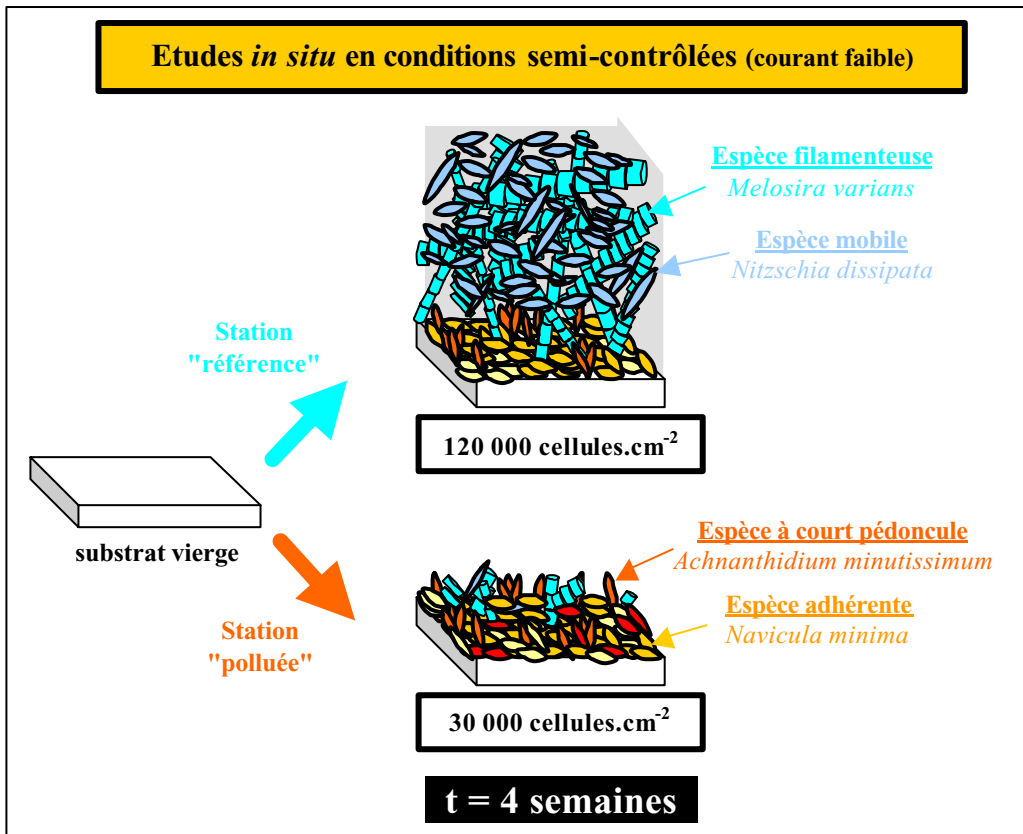


Figure 56 : Représentation schématique de l'architecture des communautés de diatomées "résidentes", développées sur les substrats artificiels vierges le long du gradient de pollution polymétallique (Cd/Zn) de la rivière Lot et du Riou-Mort, au niveau de la station "référence" et de la station "polluée", au cours des études *in situ* en conditions semi-contrôlées et en conditions non contrôlées.

Ainsi, les principales différences environnementales observées entre nos deux séries d'études *in situ* ont concerné la vitesse du courant, avec des valeurs supérieures et variables entre les stations en 1999, et la température, avec des valeurs inférieures et variables entre les stations en 1998.

C-2. HYPOTHESES CONCERNANT LES EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE SUR LA STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES

C-2.1. Des perturbations structurales importantes au niveau des communautés exposées aux métaux dès la phase initiale de leur développement, moins prononcées cependant sur les substrats immergés dans les cours d'eau, en raison des effets concomitants du courant

Les résultats des études *in situ* en conditions non contrôlées mettent en évidence des **perturbations de la structure des communautés de diatomées "résidentes" sur la station polluée**, comparables à celles observées dans les canaux de terrain, et qui pourraient être attribuées aux effets de la pollution métallique (**Figure 56**). Dans les deux séries d'études *in situ*, les communautés de diatomées se développant sur des substrats artificiels vierges au niveau de la station P ont en effet présenté des densités quatre fois plus faibles que sur la station R, et une composition spécifique très différente.

Cependant, au cours des études *in situ* en conditions non contrôlées, les **communautés des trois stations sont restées assez fines** sur les substrats, par rapport au développement important observé dans les canaux expérimentaux. Ceci est visible au niveau des densités, avec des valeurs sur les substrats immergés directement dans les cours d'eau (32 500 cellules.cm⁻² sur R et 8 000 cellules.cm⁻² sur P, **Figure 53**) nettement inférieures à celles observées dans les canaux (120 000 cellules.cm⁻² sur R et 30 000 cellules.cm⁻² sur P, **Figure 36**), et au niveau du développement des espèces *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata* sur la station R, ces espèces ayant présenté des abondances relatives dans les cours d'eau (à peine 10 % chacune, **Figure 54**) nettement inférieures à celles observées dans les canaux (> 70 % à elles deux après quatre semaines de colonisation, **Figure 39**).

Cette réduction du développement des communautés, au cours de notre deuxième série d'études *in situ*, peut être attribuée à l'augmentation des effets **érosifs du courant** entre les canaux expérimentaux et les cours d'eau. En conséquence, la grande différence d'épaisseur

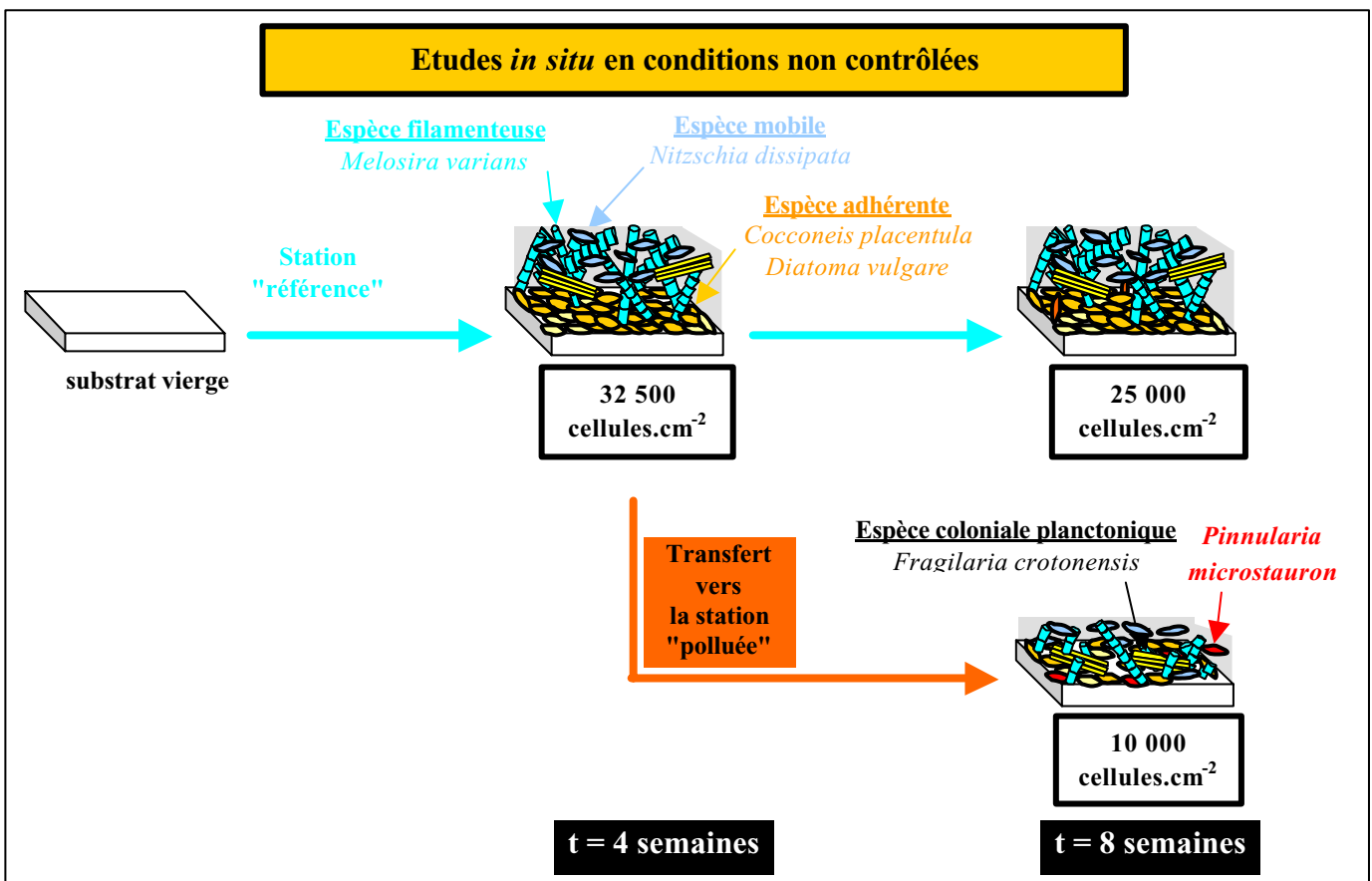
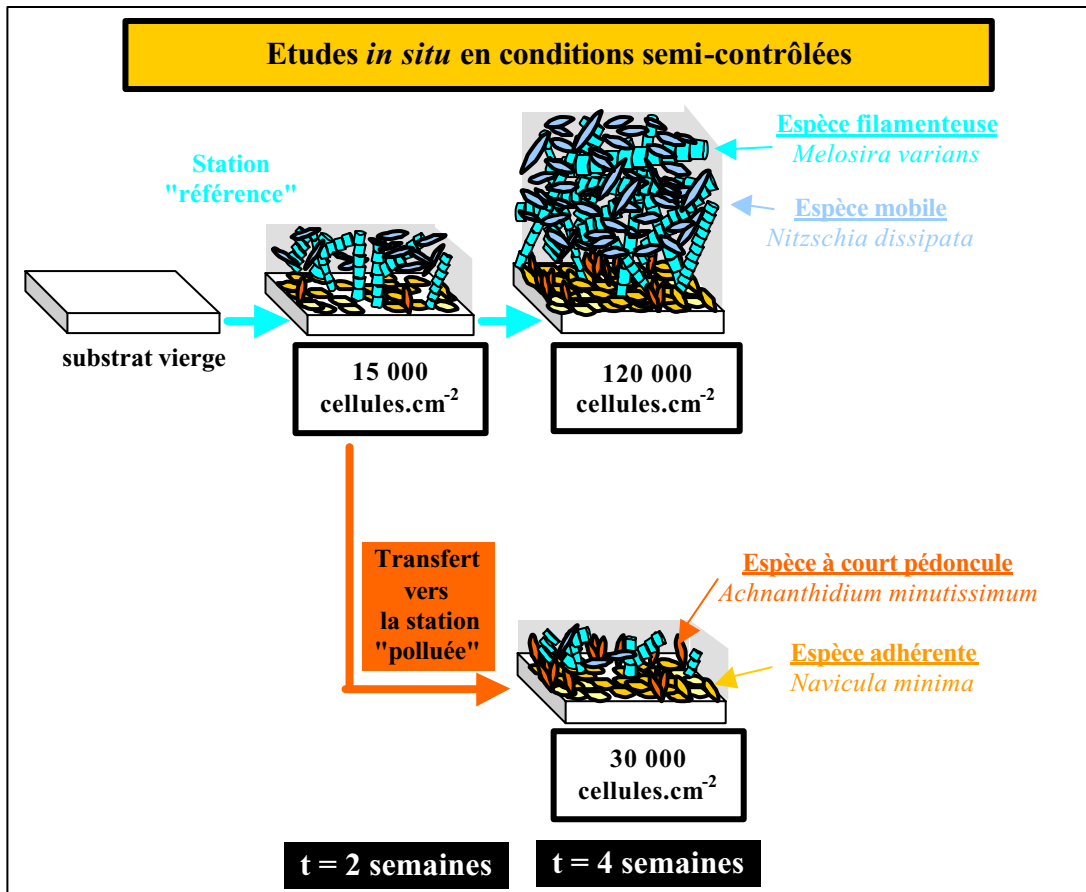


Figure 57 : Représentation schématique de l'évolution des communautés de diatomées transférées le long du gradient de pollution polymétallique (Cd/Zn) de la rivière Lot et du Riou-Mort, depuis la station "référence" vers la station "polluée", au cours des études *in situ* en conditions semi-contrôlées et en conditions non contrôlées.

observée dans les canaux expérimentaux entre les communautés de la station R et celles de la station P, et qui pourrait être liée aux effets de la pollution métallique, a été beaucoup moins visible dans les cours d'eau. Les effets supposés des métaux sur l'architecture en trois dimensions des communautés pourraient donc être atténués par les **effets concomitants des autres facteurs environnementaux**, par exemple dans le cas où de fortes vitesses de courant ralentiraient le développement global des communautés. Rappelons qu'une réduction du développement de *M. varians* et *N. dissipata* avait également été observée au cours de notre première série d'études *in situ*, entre les communautés développées dans les canaux et les communautés naturelles, qui s'étaient développées pendant de longues périodes de temps au niveau des substrats du lit des cours d'eau (jusqu'à plusieurs mois, depuis la dernière crue) (**Figure 41**). Cependant, une décroissance encore plus marquée des abondances relatives de *M. varians* et *N. dissipata* a été observée au niveau des communautés développées dans les cours d'eau depuis peu de temps, sur les substrats artificiels utilisés au cours des études *in situ* en conditions non contrôlées (**Figure 54**). Ceci permet de supposer que l'action érosive du courant aurait un effet très prononcé sur la structure des communautés à court-terme, au début de la colonisation des substrats, masquant partiellement les effets supposés de la pollution métallique, mais que cet effet négatif du courant s'atténuerait à long terme, avec le temps de colonisation.

C-2.2. Des perturbations structurales moins importantes au niveau des communautés exposées aux métaux à maturité, qui pourraient être liées à un rôle protecteur de la matrice périphytique

Lors des études *in situ* en conditions non contrôlées, les conséquences du transfert vers la station P de communautés développées sur la station R ont été comparables à celles observées dans les canaux (**Figure 57**). La structure des communautés "transférées" a globalement évolué dans les deux cas pour se rapprocher de celle des communautés "résidentes" de la station P (**Figure 56**), du point de vue de la densité et de la composition spécifique. Ces **perturbations de la structure des communautés en stade avancé de développement** pourraient être liées aux effets de la pollution métallique.

Cependant, les conséquences du transfert ne sont pas apparues avec la même **rapidité** au cours de nos deux études. En effet, elles étaient nettement visibles au sein des canaux une semaine seulement après le transfert, d'après les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) prenant en compte les abondances relatives des 55 espèces les mieux

	ETUDES <i>IN SITU</i> EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES	ETUDES <i>IN SITU</i> EN CONDITIONS NON CONTROLEES
Abondances relatives station R > station P	<p>MVAR <i>Melosira varians</i></p> <p>NDIS <i>Nitzschia dissipata</i></p>	<p>ACTT <i>Achnanthes catenata</i> AFOR <i>Asterionella Formosa</i> AMIN <u><i>Achnantheidium minutissimum</i></u> CDUB <i>Cyclostephanos dubius</i> CSTE <i>Cyclotella stelligera</i> CTUM <i>Cymbella tumida</i> FCAP <i>Fragilaria capucina</i> GMMI <i>Gomphoneis minuta</i> GNOD <i>Gyrosigma nodiferum</i> GYAT <i>Gyrosigma attenuatum</i></p> <p>NCPR <i>Navicula capitatoradiata</i> NCRY <i>Navicula cryptocephala</i> NCTE <i>Navicula cryptotenella</i> NRCH <i>Navicula reichardtiana</i> NRHY <i>Navicula rhynchocephala</i> NDIS <i>Nitzschia dissipata</i></p>
Abondances relatives station R < station P	<p>AAMB <i>Aulacoseira ambigua</i> AFOR <i>Asterionella formosa</i> ALFR <i>Achnanthes lanceolata ssp. frequentissima</i> AMIN^a <u><i>Achnantheidium minutissimum</i></u> CDUB <i>Cyclostephanos dubius</i> CINV <i>Cyclostephanos invisitatus</i> CMEN <i>Cyclotella meneghiniana</i> CPLA <i>Cocconeis placentula</i> CPLE <i>Cocconeis placentula var. euglypta</i></p> <p>FULN <i>Fragilaria ulna</i> GPAR <i>Gomphonema parvulum</i> NLAN <i>Navicula lanceolata</i> NMIN <i>Navicula minima</i> NLIN <i>Nitzschia linearis</i> NPAL <i>Nitzschia palea</i> PMIC <i>Pinnularia microstauron</i></p> <p>RABB <i>Rhoicosphenia abbreviata</i> SANG <i>Surirella angusta</i> SBRE <i>Surirella brebissonii</i> FCGT <i>Fragilaria capucina var. gracilis fo. teratogene</i></p>	<p>ALFR <i>Achnanthes lanceolata ssp. frequentissima</i></p> <p>FCRO <i>Fragilaria crotonensis</i></p> <p>GPAR <i>Gomphonema parvulum</i></p> <p>NMIN <i>Navicula minima</i> NLIN <i>Nitzschia linearis</i></p> <p>PMIC <i>Pinnularia microstauron</i> PGLO <i>Pinnularia globiceps</i></p> <p>SANG <i>Surirella angusta</i></p>

Figure 58 : Liste des Diatomées ayant présenté des abondances relatives supérieures sur la station "référence" (R) ou sur la station "polluée" (P), lors des études *in situ* menées le long du gradient de pollution polymétallique (Cd/Zn) de la rivière Lot, en conditions semi-contrôlées et en conditions non contrôlées, d'après les résultats des analyses en composantes principales (ACP) (cf. Figures 38, 45 et 55).

^a AMIN n'a pas été révélée comme caractérisant la station P selon les résultats de l'ACP (cf. Figure 38), mais a tout de même présenté des abondances relatives significativement supérieures sur cette station après 2 semaines de colonisation (cf. Figure 39).

représentées au sein des communautés (**Figure 45**). En revanche, elles ont été plus progressives lors de notre deuxième série d'études *in situ*, la composition spécifique globale des communautés "transférées" étant encore éloignée de celle des communautés "résidentes" de la station P deux semaines après le transfert, et même encore deux semaines plus tard (**Figure 55**).

Ces résultats confortent les hypothèses émises par plusieurs auteurs concernant les **qualités protectrices de la matrice organique** des biofilms vis-à-vis du "stress" métallique (Lock *et al.* 1984, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a). En effet, les communautés développées dans les canaux n'avaient pas encore atteint leur stade de maturité au moment du transfert, après seulement deux semaines de colonisation sur la station R, et présentaient une faible densité sur les substrats (15 000 cellules.cm⁻², **Figure 57**). Par contre, au cours des études en conditions non contrôlées, les communautés avaient atteint leur stade de maturité au moment du transfert, établi volontairement après une plus longue période de colonisation sur la station R (quatre semaines), et présentaient à ce moment là des densités nettement supérieures à celles observées dans les canaux (32 500 cellules.cm⁻², **Figure 57**). La matrice organique des communautés périphytiques, qui possède de nombreux sites de fixation des métaux (Rose and Cushing 1970, Lock *et al.* 1984, Freeman and Lock 1995, Gray *et al.* 2001), pourrait ainsi **réduire la biodisponibilité et la toxicité du Cd** à l'égard des organismes périphytiques, lors de l'exposition soudaine à une pollution métallique.

C-3. HYPOTHESES CONCERNANT LES NIVEAUX DE TOLERANCE AUX METAUX DE DIFFERENTES ESPECES DE DIATOMÉES

Les résultats des études en conditions non contrôlées permettent également de conforter les hypothèses émises lors de nos études en conditions semi-contrôlées, concernant les **niveaux de tolérance aux métaux de plusieurs espèces de diatomées (Figure 58)**. Ainsi, *N. dissipata*, qui a présenté des abondances relatives inférieures sur la station fortement polluée au cours de nos deux séries d'études de terrain, pourrait être sensible aux métaux, alors que d'autres espèces comme *Achnanthes lanceolata ssp. frequentissima*, *Gomphonema parvulum*, *Navicula minima*, *Nitzschia linearis*, *Pinnularia microstauron* ou *Surirella angustata*, qui ont présenté des abondances relatives significativement supérieures sur la station polluée, sont certainement tolérantes aux métaux.

D'autres espèces ont présenté des comportements différents entre les deux séries d'études, comme *Achnanthydium minutissimum*, caractérisée par des abondances supérieures au sein des communautés de la station R lors de notre deuxième série d'études (**Figure 55**), alors qu'elle proliférait sur la station P au sein des canaux, après deux semaines de colonisation (**Figure 39**). En outre, aucun frustule anormal de diatomée n'a été repéré en 1999, alors que des formes déformées de l'espèce *Fragilaria capucina var. gracilis* avaient été observées sur la station polluée en 1998, dans les canaux et sur les substrats naturels du lit du cours d'eau (**Figure 38 et 42**). Les frustules anormaux étant toujours observés en très faibles pourcentages au sein des communautés exposées aux métaux, d'après les informations disponibles dans la bibliographie (Besch *et al.* 1972, McFarland *et al.* 1997, Dickman 1998), l'apparition de déformations reste un phénomène difficilement détectable.

C-4. DEFINITION DES RECHERCHES SUIVANTES

L'association d'études *in situ* présentant différents niveaux de contrôle des facteurs physico-chimiques (conditions semi-contrôlées et non contrôlées) nous a donc amené à formuler certaines hypothèses concernant les effets de la pollution métallique sur les communautés de diatomées périphytiques et leur importance relative par rapport aux effets des autres variables environnementales, comme la vitesse du **courant**, dans les conditions complexes du milieu naturel.

Cependant, au cours des deux séries d'études *in situ*, certains facteurs ayant une influence sur le développement des algues périphytiques, comme la **température**, les ressources en **nutriments**¹ ou le niveau de **pollution organique**², ont présenté des variations entre les stations d'étude qui ont pu interférer avec les variations des concentrations métalliques et qui rendent incertaine l'interprétation des résultats.

Suite à ces deux séries d'études in situ, nous avons réalisé des études à l'échelle des communautés en laboratoire, qui représentent le moyen d'évaluer les effets précis des métaux en conditions fortement contrôlées, et ainsi de confirmer ou d'infirmer les hypothèses issues des résultats de terrain. Ces études en laboratoire font l'objet de la partie suivante de ce mémoire.

¹ cf. Tables 2, 3 et 4.

² cf. Partie II-A-2.2.

PARTIE V
ETUDES EN LABORATOIRE
DE LA CONTAMINATION PAR LE CADMIUM
DE COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES
COLLECTEES *IN SITU*

SOMMAIRE DE LA PARTIE V

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	109
B- EXPOSITION AU CADMIUM DE COMMUNAUTES EN PHASE INITIALE DE DEVELOPPEMENT ET DE COMMUNAUTES MATURES : évaluation en conditions contrôlées des effets de la pollution métallique sur la structure de communautés présentant différents stades de développement ¹	112
C- COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS <i>IN SITU</i> ET EN LABORATOIRE	132
C-1. REPRESENTATIVITE DES SYSTEMES EXPERIMENTAUX DE LABORATOIRE	132
C-2. EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE SUR L'ARCHITECTURE GLOBALE DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES	133
C-2.1. <i>Une réduction marquée du développement en trois dimensions des communautés exposées à la pollution dès la phase initiale de leur développement</i>	<i>133</i>
C-2.2. <i>Des perturbations plus progressives au niveau des communautés exposées à la pollution à un stade avancé de développement, qui pourraient être liées au rôle protecteur et à l'effet de "piégeage" exercés par la matrice périphytique</i>	<i>134</i>
C-3. HYPOTHESES CONCERNANT LES NIVEAUX DE TOLERANCE A LA POLLUTION METALLIQUE DE DIFFERENTES ESPECES DE DIATOMEES	135
C-4. DEFINITION DES RECHERCHES SUIVANTES	136

¹ Article accepté par *Freshwater Biology* en janvier 2002.



Figure 59 : Photographies des systèmes expérimentaux mis en place au laboratoire pour permettre le développement des communautés de diatomées périphtiques dans des conditions contrôlées.

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE

Afin de compléter notre démarche d'évaluation des effets de la pollution métallique sur la structure des communautés de diatomées périphytiques, basée sur l'association d'approches expérimentales visant à réduire la complexité du milieu naturel, une troisième série d'études a été réalisée en **laboratoire**.

Des communautés de diatomées périphytiques ont été échantillonnées en automne 2000 sur la rivière Lot, au niveau de la station "référence" présentée précédemment¹, sur des substrats artificiels immergés dans le cours d'eau pendant un mois. Ces communautés ont été introduites en suspension dans la colonne d'eau de systèmes expérimentaux de laboratoire. Chaque système assure la circulation continue d'eau dans trois canaux artificiels montés en parallèle, grâce à une pompe externe reliée à un réservoir et à une colonne de distribution, l'ensemble constituant un circuit fermé (**Figure 59**). Les canaux, contenant des substrats artificiels vierges, ont permis le développement de communautés de diatomées périphytiques dans des **conditions contrôlées** (nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats, vitesse du courant, conditions lumineuses, température, ressources en nutriments), fixées de manière à recréer des conditions proches de celles observées lors des études de terrain². Suivant ce protocole, les processus de colonisation et de développement des algues périphytiques à la surface des substrats artificiels se sont déroulés effectivement en conditions contrôlées. Notre étude se distingue ainsi des quelques expériences de laboratoire menées jusqu'à présent, qui ont consisté à évaluer les effets de la contamination métallique sur des communautés déjà développées en milieu naturel (dans des conditions non contrôlées) et introduites intactes sur leur support au sein des canaux artificiels de laboratoire (Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a).

Les systèmes ont été soumis à **trois niveaux de contamination par le Cd** : (i) un niveau contrôle (pas d'ajout de Cd) ; $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (low Cd), correspondant à la concentration moyenne en Cd mesurée sur la station la plus polluée lors de nos études de terrain le long du gradient de pollution de la rivière Lot² (**Tables 2 et 4**) ; et $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (high Cd), correspondant à une concentration nettement supérieure, mais fréquemment observée au niveau de rivières plus fortement polluées (Ivorra *et al.* 1999, Rushforth *et al.* 1981). Afin d'assurer des conditions

¹ cf. Partie II-A.2.2.

² cf. Parties III et IV.

Etude 1 : Suivi du développement des communautés avec différents niveaux de contamination par le Cd

Etude 2 : Evolution structurale de communautés exposées au Cd à un stade de développement avancé

□ contrôle
■ [Cd] = 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ("low Cd")
■ [Cd] = 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ("high Cd")

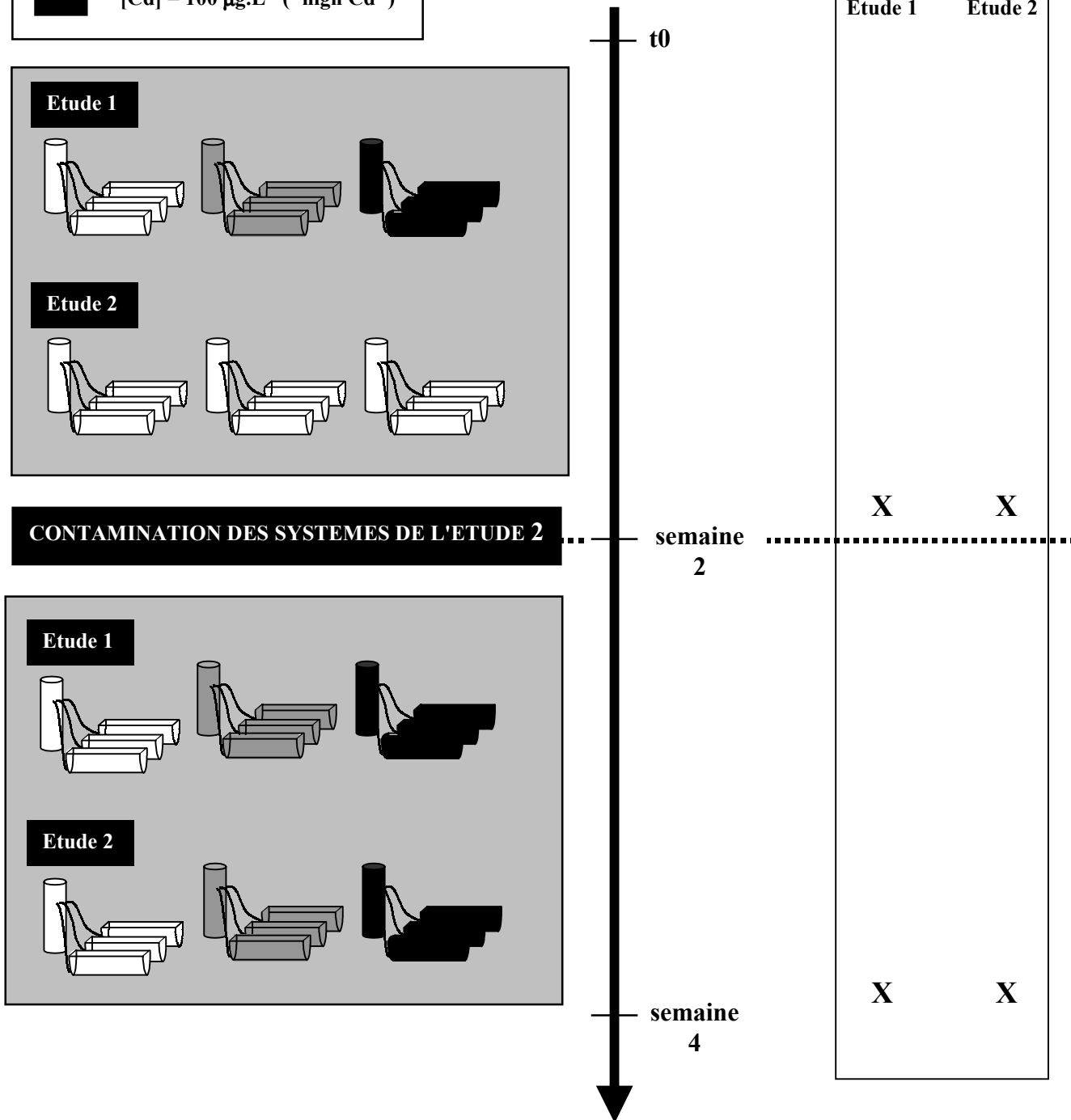


Figure 60 : Protocole des 2 études menées en parallèle dans des conditions fortement contrôlées, au sein de canaux artificiels de laboratoire.

d'exposition relativement constantes au sein de nos systèmes expérimentaux, les niveaux de contamination ont été rigoureusement contrôlés pendant toute la durée des expériences. En effet, à partir d'un ajout initial de Cd dans les systèmes expérimentaux, de nombreux facteurs contribuent à faire décroître la concentration en métal dans l'eau (adsorption sur les parois du système, bioaccumulation par les algues, etc.). Pour compenser ces phénomènes de décroissance, la concentration en Cd dans la colonne d'eau a été dosée très régulièrement, et des ajouts adaptés de métal ont été effectués quotidiennement dans chaque système expérimental.

Deux études ont été menées en parallèle, correspondant aux deux études réalisées au cours de chaque série d'expériences de terrain, afin d'évaluer les effets de la pollution métallique à **différents stades du développement des communautés** de diatomées. La durée de ces études (4 semaines) a été fixée en fonction des résultats d'une expérience préliminaire, réalisée pour déterminer le délai nécessaire à l'atteinte du stade de maturité des communautés dans nos conditions expérimentales de laboratoire (2 semaines).

Dans une **première étude**, nous avons suivi l'installation et le développement des communautés de diatomées sur des substrats artificiels vierges avec les trois niveaux de contamination en Cd (control, low Cd, high Cd), afin d'évaluer les effets de la contamination sur des communautés exposées au Cd dès la phase initiale de leur développement. Trois systèmes expérimentaux ont été mis en place pour cette étude : un système a servi de contrôle, et les deux autres ont été contaminés (10 ou 100 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$) pendant toute la durée de l'expérience (4 semaines) (**Figure 60**). Des échantillons de périphyton ont été prélevés après deux et quatre semaines de colonisation, dans les trois canaux de chaque système (3 répétitions par système).

Dans une **deuxième étude**, nous avons suivi l'évolution structurale de communautés soumises à la contamination par le Cd après une première période de colonisation de deux semaines sans contamination, afin d'évaluer les effets de la contamination sur des communautés exposées au Cd à une phase plus avancée de leur développement (maturité). Trois autres systèmes expérimentaux ont été mis en place pour cette étude : un système a servi de contrôle, et les deux autres ont été contaminés (10 ou 100 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$) à partir de la fin de la deuxième semaine de colonisation (**Figure 60**). Des échantillons de périphyton ont été prélevés juste avant le début de la contamination (semaine 2), et deux semaines plus tard (semaine 4), dans les trois canaux de chaque système (3 répétitions par système).

Ces études de laboratoire permettent d'évaluer les effets à court-terme de la contamination par le cadmium, sur des communautés de diatomées non acclimatées à la pollution, provenant de la station "référence", et présentant un stade initial ou avancé de

développement sur les substrats. Rappelons que les études de terrain menées précédemment¹ prenaient en compte les effets à court-terme de la pollution métallique, sur des communautés "transférées" depuis la station "référence" vers une station polluée, mais aussi les effets à long-terme, sur des communautés de diatomées "résidentes" des stations polluées, qui ont pu développer des mécanismes d'adaptation aux métaux.

¹ cf. Parties III et IV.

**B- EXPOSITION AU CADMIUM
DE COMMUNAUTES EN PHASE INITIALE DE DEVELOPPEMENT
ET DE COMMUNAUTES MATURES :
évaluation en conditions contrôlées des effets de la pollution métallique
sur la structure de communautés présentant
différents stades de développement**

*Structural perturbations induced by cadmium on periphytic diatom communities
within indoor artificial streams¹*

Gold Caroline ^(1,2), Feurtet-Mazel Agnès ^{(1)*}, Coste Michel ⁽²⁾, Boudou Alain ⁽¹⁾

(1) Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), UMR CNRS 5805, Université Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

(2) Cemagref, 50 avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France

* Corresponding author. Tel.: +33(0)5-56-22-39-20; fax: +33(0)5-56-54-93-83. E-mail address: a.feurtet-mazel@ecotox.u-bordeaux.fr

KEYWORDS

Periphyton - Biofilm - Diatoms - Cadmium – indoor artificial streams

¹ Article accepté par *Freshwater Biology* en janvier 2002.

SUMMARY

Two experiments were performed with periphytic diatoms originating from the River Lot (France) and allowed to grow on clear substrates within indoor artificial streams, under three cadmium (Cd) levels (control, low Cd = 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and high Cd = 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$), in order to test the effects of the metal: (i) on the settlement and development of diatom communities on substrata (experiment 1, four weeks Cd exposure), and (ii) on pre-developed communities, grown over a two-week period without contamination (experiment 2, two weeks Cd exposure). During experiment 1, growth and taxonomic composition of diatom communities clearly differed under Cd exposure, leading to a very different community architecture compared to the control, with biofilms more addressed to substrata under low Cd and remaining very thin and patchy under high Cd. Exposure of developed diatom communities (experiment 2) to Cd induced only minor variations in taxonomic composition, demonstrating the protective role of the developed organic matrix against metal stress. These results confirm the potential validity of periphytic diatom communities as indicators of metal pollution, although significant structural changes would take longer within developed communities.

INTRODUCTION

Benthic algal assemblages are essential photosynthetic components in many rivers, responsible for a great proportion of the primary production (Biggs 1996). Because they are composed of a large number of species with various ecological tolerances and preferences, they constitute a well adapted biological model for environmental monitoring (McCormick and Cairns 1994; Lowe and Pan 1996). In particular, periphytic diatom communities are routinely used in running waters as biological indicators of organic pollution (Descy and Coste 1991) and eutrophication (Kelly and Whitton 1995).

Modifications of the structural characteristics of periphytic diatom communities under metal pollution have been revealed by several field studies (Rushforth *et al.* 1981; Deniseger, Austin and Lucey 1986; Ivorra *et al.* 1999; Genter and Lehman 2000), including two studies we have conducted along a metal pollution gradient on the River Lot (SW France) (Gold C., unpublished data¹). Nevertheless, the validity of diatom communities as specific indicators of metal pollution is

¹ cf. Parties III et IV.

difficult to determinate under *in situ* conditions. Even if the sites selected show clear differences in metal concentrations, both in the water column and sediment, variations in other environmental factors of natural and/or anthropogenic origin are inevitable between such sites. The structural characteristics of periphytic diatom communities are influenced by a large number of factors occurring during biofilm development, such as current velocity (Ghosh and Gaur 1998), temperature (Patrick 1971), light intensity or nutrient availability (Rosemond, Mulholland and Brawley 2000).

To test the hypotheses generated by field results under controlled conditions, we performed laboratory experiments with periphytic diatoms taken from a reference site on the River Lot, upstream of the industrial discharge of metals into the river. The experiments were based on diatom inoculates added to the water column of artificial streams, in order to analyse the kinetics of substratum colonization at three exposure levels of cadmium (Cd): control, 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (low Cd), corresponding to the Cd concentrations measured at the most polluted site on the River Lot, and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (high Cd), corresponding to a higher exposure condition, but comparable to that reported in more highly polluted rivers (Ivorra *et al.* 1999; Rushforth *et al.* 1981).

Two experiments of one month were conducted simultaneously: (i) the first was based on four weeks' exposure to Cd, to investigate the effects of the metal on the settlement and development of periphytic diatom communities; (ii) the second experiment, based on two weeks' exposure to Cd, investigated the perturbations on already developed communities, grown over a two-week period without contamination. These experiments allowed the entire development of periphytic communities on clear substrata under controlled conditions. Other laboratory experiments have mainly studied the impacts of metals on intact river biofilms, brought back from the field, which had therefore developed under non-controlled conditions (Medley and Clements 1998; Ivorra *et al.* 2000 a). For each experiment, structural perturbations induced by Cd were analyzed by comparing diatom community density and taxonomic composition under the different contamination levels, after two and four weeks of colonization. Results from the two experiments also enabled us to discuss the role played by the organic matrix of diatom communities, hypothesized as providing protection against metal stress via the numerous binding sites on its surface (Ivorra *et al.* 2000 a).

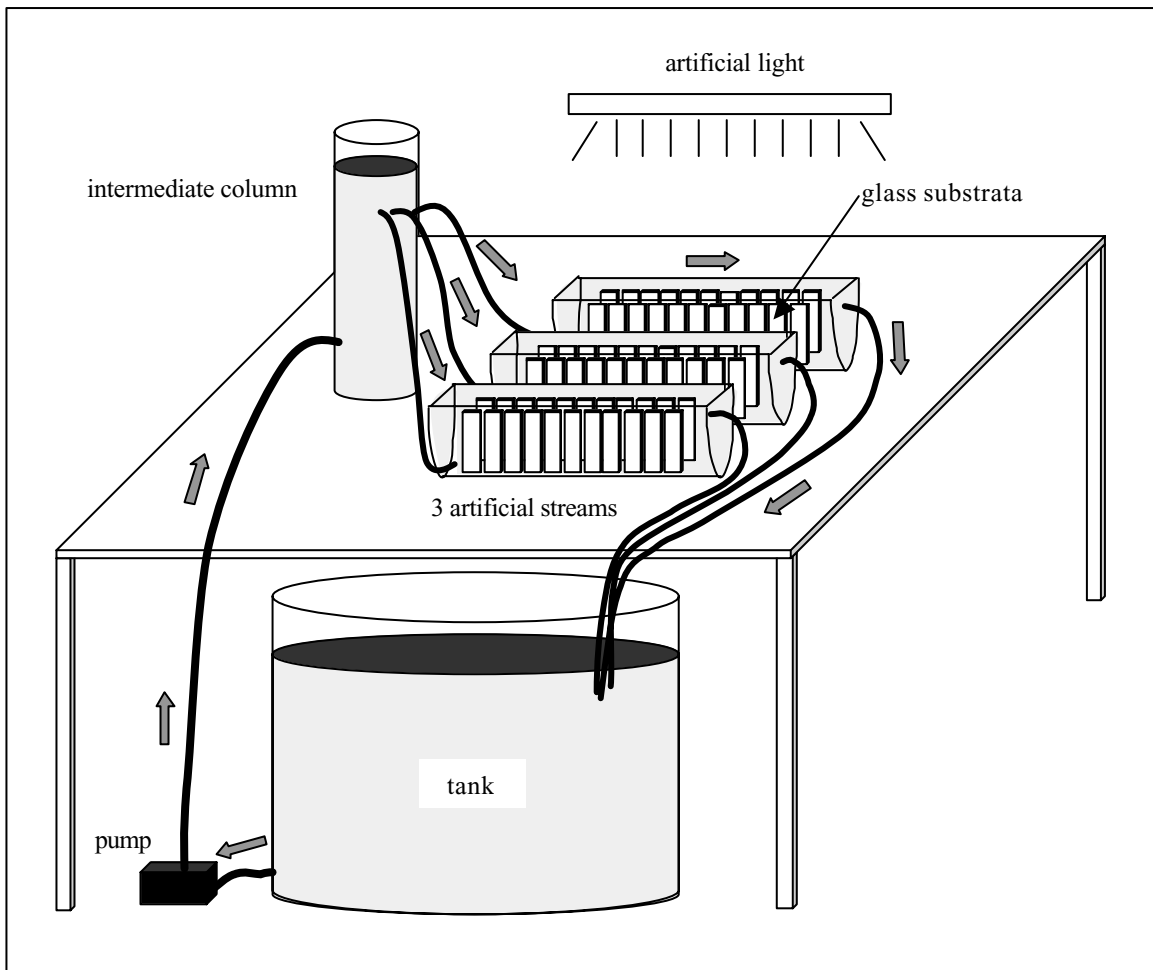


Figure 61: Schematic representation of a closed experimental system, consisting of 3 artificial streams (50 cm length, 6 cm radius), each containing 22 free glass substrata (7.6 x 2.6 cm). Grey arrows indicate flow direction.

MATERIALS AND METHODS

River periphyton collection

Periphytic communities were collected from the River Lot (SW France), at a reference site upstream from the junction with the Riou-Mort, a small tributary that carries seepage from a former zinc factory, and is responsible for most of the metal input into the River Lot. Very low metal concentrations were measured in the water column and sediment compartments at the reference site, similar to background levels in the area (Andres *et al.* 1999). Sampling was carried out in the autumn, because diatoms are dominant in the periphyton during this season (Whitton 1980).

One plastic rack equipped with floats and containing vertical artificial substrata for periphytic algal attachment (30 x 6 cm glass slides) was immersed in the water column at a depth of 15 cm in October 2000. After four weeks of colonization, the rack was removed from the river and substrata were immediately scraped with a blade, and rinsed with water. The collected periphyton was pooled in a single plastic vial and transported to the laboratory in cool boxes, to ensure survival of the algae in a good state.

Laboratory experimental systems

Six closed experimental systems were set up in the laboratory, each consisting of three small artificial streams (2.8 L volume each) connected in parallel to a tank (**Figure 61**). An external pump allowed continuous circulation of water through the system, utilizing an intermediate column which divided the flow equally between the three streams, at a rate of 10 mL.s⁻¹, corresponding to a velocity of 0.2 cm.s⁻¹ into the streams. Artificial streams were constructed from half-PVC tubes (50 cm length, 6 cm radius), each containing 22 clear substrata (7.6 x 2.6 cm glass slides, 30 cm² surface to be colonized), inserted vertically, side by side into two racks, parallel to the current (**Figure 61**). The water surface was about 0.5 cm above the substrata.

All systems were filled with 35 L of four times diluted modified WC culture medium (**Table 6**) without EDTA, which presents very high binding capacities for metals (Stauber and Florence 1989), and supplemented with silica, an essential diatom nutrient. This ensured nutrient levels between the high and optimal values found in culture media and the lower values of natural river waters. The systems were positioned in a thermoregulated room, at a temperature

Nutrients	Final concentration (mg.L⁻¹)
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	9
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	9.25
NaHCO ₃	3.15
NaNO ₃	21.25
K ₂ HPO ₄	2.17
FeCl ₃ , 6 H ₂ O	1.05
H ₃ BO ₃	0.25
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	45.10 ⁻³
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	5.5.10 ⁻³
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	2.5.10 ⁻³
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	2.5.10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	1.5.10 ⁻³
Thiamine HCl	25.10 ⁻³
Biotin	125.10 ⁻⁶
B12 vitamin	125.10 ⁻⁶
Na ₂ SiO ₃ , 9 H ₂ O	71

Table 6: Composition of the four times diluted modified WC culture media, without EDTA and supplemented with silica.

of 15 ± 0.5 °C (average autumnal temperature), and a light intensity of 55 ± 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ at the water-air interface for photosynthetically active radiations (400-700 nm) (light:dark regime, 10h/14h). Frequent measurements of the temperature, pH, dissolved oxygen concentration and oxygen saturation level (WTW, Weilheim, Germany) were taken in the water column of the experimental systems at the end of the diurnal period, as well as the collection of water samples for nutrient concentrations (phosphate, silica and nitrate), according to standardized colorimetric methods (French norms nos. NF EN 1189, NF T 90007 and NF EN ISO 13395, respectively) (AFNOR 2001). To compensate for nutrient decreases due to algal consumption and development, adapted volumes of culture medium were added to the experimental systems, according to prevailing nutrient conditions.

At the beginning of the experiments, equal volumes of the homogenized periphyton suspension from the River Lot were introduced into the water column of the six experimental systems. For experiment 1 (four weeks Cd exposure), one system was left free of contamination (control), while two other systems were contaminated throughout the entire experiment, at 10 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ (low Cd) and 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ (high Cd) respectively. For experiment 2 (two weeks Cd exposure), three systems were left without contamination during the first two weeks of the experiment, to allow development of reference communities on substrata. For the next two weeks, two systems were contaminated, at 10 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ (low Cd) and 100 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{L}^{-1}$ (high Cd) respectively, while the third system remained as control. The two experiments therefore used three systems each, with the artificial streams of each system allowing three replicates of each treatment.

Cd contamination of the water column

Contamination of the water column of the experimental systems was based on daily additions of aqueous solutions of cadmium chloride (CdCl_2 , 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Merck, Darmstadt, Germany) to obtain final nominal concentrations of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (low Cd) or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (high Cd). The amounts of Cd added daily to each system were adapted to anticipate and compensate for decreases in metal concentration over the 24h-cycles, and corresponded to twice the difference between the nominal concentration desired and the concentration measured at the end of the daily cycles. This allowed us to maintain a relatively steady concentration around the nominal level, and is essential, although extremely constraining, to ensure satisfactory monitoring of the contamination conditions for the organisms, given the many factors that

contribute to the decrease in Cd concentrations in the water column of the experimental systems.

Cd concentrations in the unfiltered and filtered (0.45 μm polycarbonate Cyclopore filters - Autotop WF, Polylabo) water samples were determined by atomic absorption spectrophotometry (Varian AA400 – Zeeman correction, Victoria, Australia), equipped with a graphite tube atomizer (model GTA96, Varian) and autosampler. Samples were preserved by acidification with HNO_3 (2%); 10 μL were taken and mixed before atomisation with 4 μL of a "palladium - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (50/50)" mixture, to facilitate removal of the matrix. The detection limit was 0.1 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$. Blanks and standards were run with each batch of samples.

Collection and analysis of periphytic diatom communities

After two and four weeks of colonization, four substrata occupying different positions were removed from each artificial stream. The periphyton developed on their surface was scraped with a blade to form a single sample per stream (three replicates per system), preserved in a 5% formalin solution (Formol 37%). The streams were reset with new glass slides, to preserve identical internal flow conditions.

Diatom density in the periphyton samples was estimated using a Nageotte counting chamber, by enumerating the total number of diatoms in 30 fields (1.25 μL each, 0.5 mm depth), using light microscopy at 200 x magnification (photomicroscope Leica DMRB, Wetzlar, Germany). Data were reported as cells per unit area of substratum (cells.cm^{-2}).

Diatom species were identified at 1,000 x magnification, by examining permanent slides of cleaned diatom frustules, digested in boiling H_2O_2 (30%) and HCl (35%), and mounted in a high refractive index medium (Naphrax, Northern Biological Supplies Ltd, UK; $\text{RI} = 1.74$). 400 diatom valves were identified on each slide, according to Krammer and Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a, 1991b). Relative abundances of the species (percentage) and species richness were estimated, and diatom diversity was calculated using the Shannon-Weaver index (H'): $H' = -\sum (p_i \log_2 p_i)$, with p_i = relative abundance of the species i .

Data treatment

For each experiment, one-way ANOVA was performed using STATISTICA Software (Version 5, 97 Edition), after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term), to detect significant differences in diatom community structure (species richness, diversity, density and

	Experiment 1			Experiment 2		
	control	low Cd	high Cd	control	low Cd	high Cd
Temperature (°C)	15.4 (0.2)	15.9 (0.1)	15.9 (0.4)	15.3 (0.2)	15.7 (0.2)	15.7 (0.1)
pH	8.6 (0.3)	8.4 (0.1)	8.3 (0.05)	8.7 (0.4)	8.6 (0.3)	8.6 (0.3)
O ₂ (mg.L ⁻¹)	9.5 (0.2)	9.4 (0.3)	9.4 (0.3)	9.7 (0.2)	9.7 (0.2)	9.8 (0.1)
O ₂ saturation level (%)	96.9 (0.6)	95.3(2.9)	95.3 (3)	98.6 (1.5)	97.7 (2)	98.9 (2.2)

Table 7: Physicochemical parameters (mean value and standard deviation in brackets, n=5) measured during the four weeks experimental period in the water column of the control, low Cd and high Cd contaminated experimental systems of the experiments 1 (four weeks Cd exposure) and 2 (two weeks Cd exposure).

Nutrients (mg.L ⁻¹)		Experiment 1			Experiment 2		
		control	low Cd	high Cd	control	low Cd	high Cd
PO ₄ ²⁻	week 0	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8
	week 1	0.5	0.6	0.6	0.4	0.6	0.5
	week 2	*	0.5	0.5	*	*	*
	week 3	0.5	0.3	0.5	0.5	0.6	0.6
	week 4	*	*	0.4	*	*	0.1
NO ₃ ⁻	week 0	15	15	16	14	15	14
	week 1	12	14	15	11	12	12
	week 2	4.5	13	14	3.5	5.3	4
	week 3	14	12	16	11	15	13
	week 4	5	13	16	6	14	12
SiO ₂	week 1	8	14	15	7.5	12	10.5
	week 3	7.5	10	14	7	3.5	5

Table 8: Nutrient concentrations (expressed for the elements) measured during the four weeks experimental period in the water column of the control, low Cd and high Cd contaminated experimental systems of the experiments 1 (four weeks Cd exposure) and 2 (two weeks Cd exposure).
* : < detection limit (0.1 mg.L⁻¹ for PO₄²⁻)

relative abundances): (i) for each sampling time (2 and 4 weeks), between the three exposure levels (control, low Cd and high Cd); and (ii) for each exposure level, between the two sampling times. In order to test the repeatability of the experimental systems, one-way ANOVA was also performed on each sampling occasion for all the non-contaminated systems - i.e. at week 2: the control systems of the two experiments and the systems to be contaminated of experiment 2; and at week 4: the control systems of the two experiments, to detect significant differences in diatom community structure. If the null hypothesis was rejected, we used the Least Squares Deviation test (LSD), to detect significant differences between groups. For all statistical results, a probability of $P < 0.05$ was considered significant.

Principal component analyses (PCA) were performed using SPAD Software (version 4), on relative abundances of diatom species: (i) within communities collected in both experiments, and (ii) within communities collected in experiment 2 only.

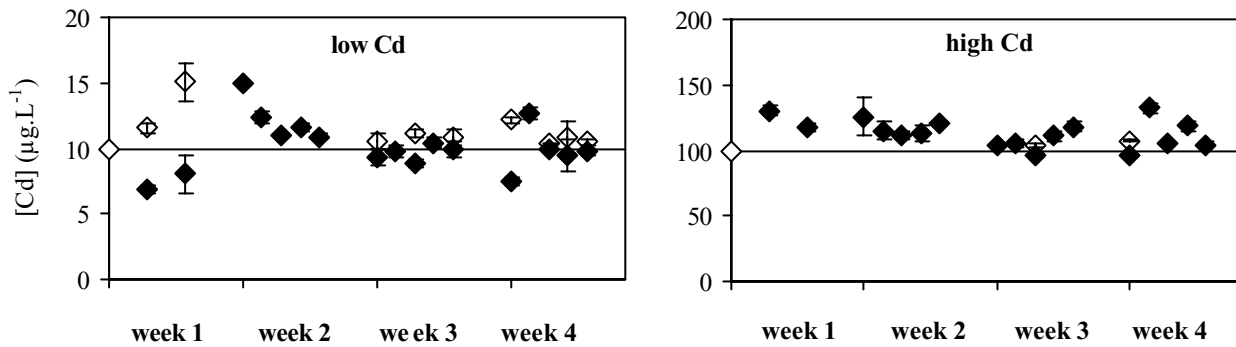
RESULTS

Physicochemical characteristics of the water column

Frequent measurements of the physicochemical parameters in the water column (**Table 7**) produced mean values of 15.5°C, pH 8.5, and 9.5 mg.L⁻¹ dissolved oxygen (more than 90% saturation) in all the systems, with little variation over the four weeks experimental period.

Phosphate and nitrate concentrations (**Table 8**) were around 0.8 mg.L⁻¹ and 15 mg.L⁻¹ respectively, in all systems at the beginning of the experiments (week 0). Concentrations decreased gradually in the contaminated systems of experiment 1 (four weeks Cd exposure), whereas sharp decreases were observed in the non-contaminated systems - i.e. the control systems of both experiments, and the systems to be contaminated of experiment 2 (two weeks Cd exposure), with values below the detection limit for phosphate (0.1 mg.L⁻¹) and around 4.5 mg.L⁻¹ for nitrate at the end of week 2. Appropriate additions of culture medium at the end of week 2 restored nutrient levels to that in the contaminated systems, until the end of week 3. Nevertheless, at the end of the experiment (week 4), lower phosphate concentrations were again measured in the control systems of both experiments and in the contaminated systems of experiment 2, and also in system low Cd of experiment 1. The control systems also had lower nitrate concentrations.

a - Experiment 1



b - Experiment 2

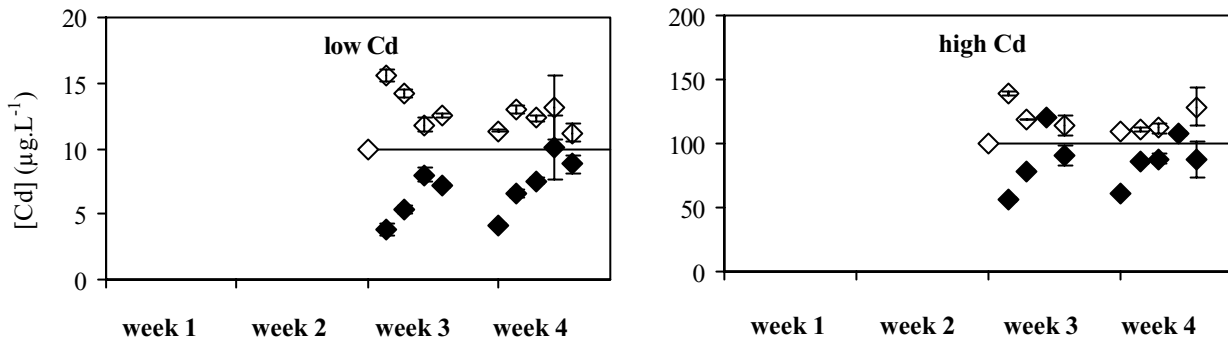
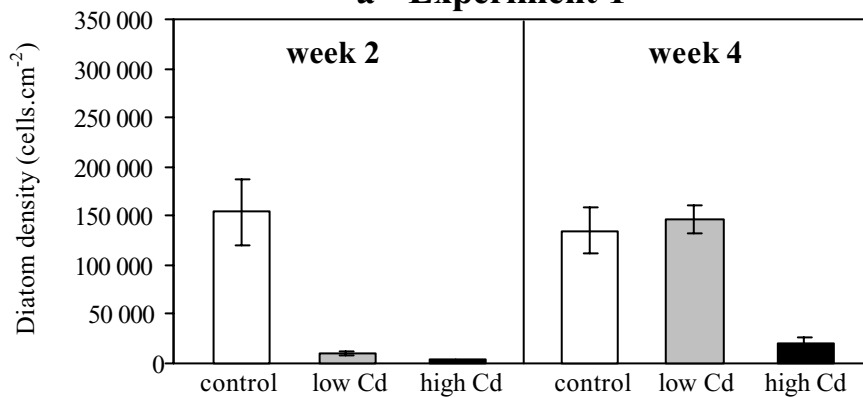


Figure 62: Cadmium concentrations in the water column of the contaminated experimental systems (low Cd and high Cd), during: **(a)** the experiment 1 (four weeks Cd exposure), and **(b)** the experiment 2 (two weeks Cd exposure).

Black symbols: mean concentrations measured at the end of the 24-h cycles. White symbols: mean theoretical concentrations obtained after Cd additions. Vertical bars: standard deviations of means (n=3). Horizontal lines = nominal concentrations desired.

a - Experiment 1



b - Experiment 2

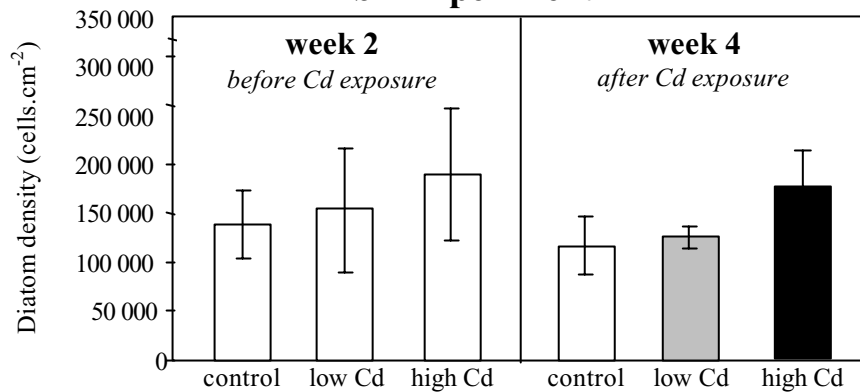


Figure 63: Diatom densities (mean value and standard deviation, n=3) on artificial substrata (cells.cm⁻²) in the control, low Cd and high Cd contaminated experimental systems, during: **(a)** the experiment 1 (four weeks Cd exposure), and **(b)** the experiment 2 (two weeks Cd exposure).

White histograms indicate the uncontaminated systems, and grey and black histograms the contaminated systems.

Silica concentrations (**Table 8**), measured only at the end of weeks 1 and 3, were also higher in the contaminated systems of experiment 1 (around 15 mg.L⁻¹), compared to other systems (mean of weeks 1 and 3 around 7.5 mg.L⁻¹).

Maintenance of Cd concentrations in the water column

More than three hundred measurements of Cd in the water column of the experimental systems were made and, based on these, daily additions of Cd were modified to maintain the required nominal concentrations: 10 µg.L⁻¹ (low Cd) and 100 µg.L⁻¹ (high Cd). Results showed that a major proportion of the metal was always distributed in the dissolved phase (> 95 %).

Cd concentrations measured in the water column of the contaminated experimental systems at the end of the 24-h cycles are shown in **Figure 62**, with theoretical concentrations obtained after Cd additions. In experiment 1 (four weeks Cd exposure), average contamination pressure (mean of theoretical and measured values) can be estimated at 11 µg.L⁻¹ and 110 µg.L⁻¹ in low Cd and high Cd systems respectively, over the month of exposure. In experiment 2 (two weeks Cd exposure), low Cd and high Cd systems were exposed to average Cd concentrations around 10 µg.L⁻¹ and 103 µg.L⁻¹ respectively, during the two weeks of exposure, with markedly higher daily decreases in Cd concentrations compared to experiment 1. In both experiments, little variation occurred between the three replicates of each system.

Quantitative characterization of diatom communities

Diatom densities on artificial substrata (**Figure 63**) allowed the quantitative characterization of communities.

In experiment 1 (four weeks Cd exposure, **Figure 63 a**), high density was observed in the control system (blue histogram) after two weeks of colonization, with around 150,000 cells.cm⁻². Values in the contaminated systems (red and black histograms) were significantly lower, densities decreasing strongly with increased contamination, with around 9,300 cells.cm⁻² under low Cd and less than 2,500 cells.cm⁻² under high Cd. After four weeks of colonization, density in the control system was not significantly different from that at week 2. On the other hand, a large increase in density occurred in the contaminated systems between weeks 2 and 4: x 16 under low Cd and x 9 under high Cd. Cell density under low Cd (around 150,000 cells.cm⁻²) was not significantly different from the control, whereas density under high Cd (around 20,000 cells.cm⁻²) was still significantly lower than in other systems.

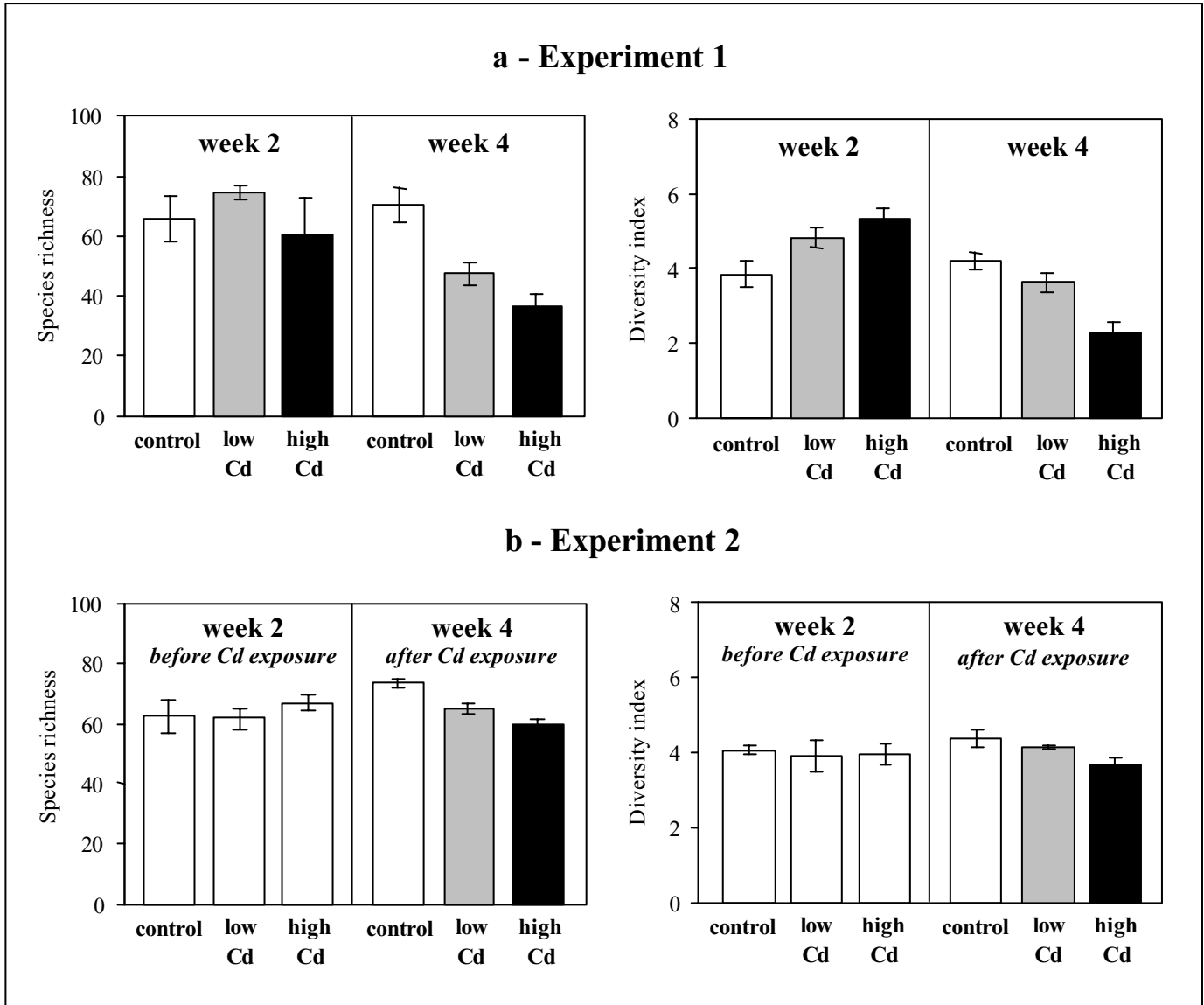


Figure 64: Diatom species richness and diversity index (mean value and standard deviation, n=3) in the control, low Cd and high Cd contaminated experimental systems, during:

(a) the experiment 1 (four weeks Cd exposure),

and (b) the experiment 2 (two weeks Cd exposure).

White histograms indicate the uncontaminated systems, and grey and black histograms the contaminated systems .

In experiment 2 (two weeks Cd exposure, **Figure 63 b**), densities in the three systems did not differ significantly after two weeks of colonization (before Cd exposure), nor were they different from that in the control system of experiment 1 (**Figure 63 a**), with around 150,000 cells.cm⁻². Nevertheless, a higher mean value was observed in system to be contaminated by high Cd. After four weeks of colonization (after Cd exposure), densities in the contaminated systems (red and black histograms) were not significantly different from those at week 2, nor significantly different from the control (blue histogram), although mean density in system contaminated by high Cd was always higher than in other systems.

Qualitative characterization of diatom communities

Qualitative characterization of diatom communities is obtained from their species richness and diversity (**Figure 64**).

In experiment 1 (four weeks Cd exposure, **Figure 64 a**), species richness was around 65 and diversity around 4 in the control system (blue histograms), after two weeks of colonization. In the contaminated systems (red and black histograms), species richness was not significantly different from the control, but diversity was significantly higher, around 5. After four weeks of colonization, species richness and diversity in the control system (blue histograms) were not significantly different from those at week 2. On the other hand, they were significantly lower in the contaminated systems (red and black histograms), decreasing with the contamination level, i.e. 47 species and a diversity of 3.6 under low Cd, and 36 species and a diversity of 2.3 under high Cd.

In experiment 2 (two weeks Cd exposure, **Figure 64 b**), species richness and diversity in the three systems did not differ significantly after two weeks of colonization (before Cd exposure), nor were they different from those in the control system of experiment 1 (**Figure 64 a**). After four weeks of colonization (after Cd exposure), species richness was significantly lower in the two contaminated systems than in the control, whereas diversity was significantly lower in system contaminated by high Cd only.

Main species of the diatom communities

Taxonomic composition of the diatom communities collected throughout the two experiments was assessed by calculating the relative abundances of the six main species (i.e.

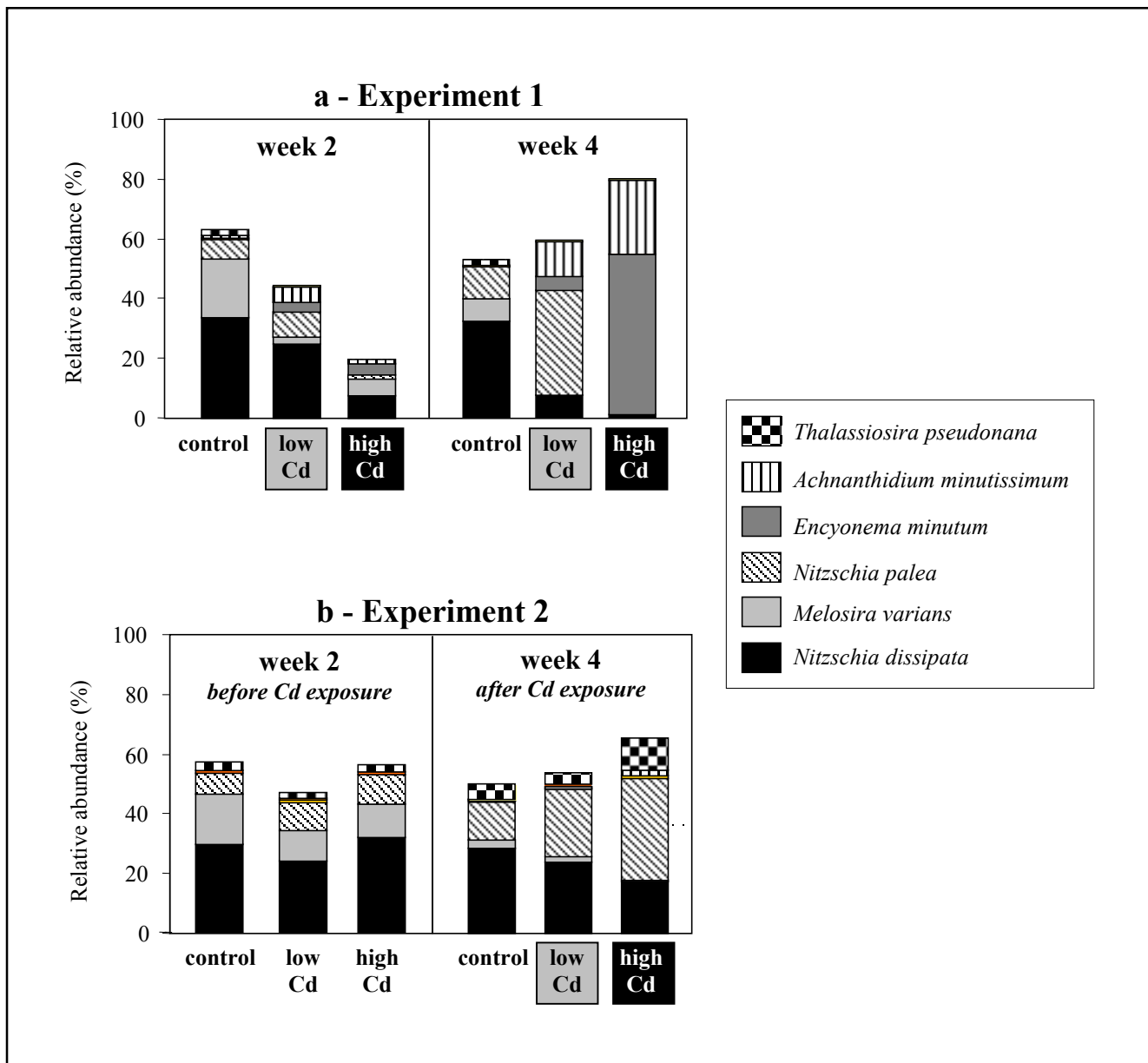


Figure 65: Relative abundances (mean value, n=3) of the 6 main species (> 10 % in at least one community) within diatom communities collected in the control, low Cd and high Cd contaminated experimental systems, during: (a) the experiment 1 (four weeks Cd exposure), and (b) the experiment 2 (two weeks Cd exposure). Grey and black labels indicate the contaminated systems.

the species reaching a mean relative abundance > 10 % in at least one of the sampled communities) (**Figure 65**).

In experiment 1 (four weeks Cd exposure, **Figure 65 a**), main species composition in the control system was characterized by high proportions of *Nitzschia dissipata* (30 %), *Melosira varians* (14 %) and relatively lower abundances of *Nitzschia palea* (8 %), after two weeks of colonization. On the other hand, main species compositions in the contaminated systems (red and black labels) were different from the control, markedly so under high Cd. *M. varians* contributed significantly less in both contaminated systems (< 6 %), whereas *Achnantheidium minutissimum* and *Encyonema minutum* were significantly more abundant than in the control. *N. dissipata* and *N. palea*, with similar relative abundances under low Cd and in the control, were significantly lower under high Cd. After four weeks of colonization, main species composition in the control system was comparable with that at week 2, with lower abundances only of *M. varians* (< 8 %). On the other hand, in the contaminated systems (red and black labels), main species compositions changed markedly after week 2, and became very different from the control. *N. dissipata* decreased considerably, to only around 7.5 % under low Cd and 1 % under high Cd at week 4, and *M. varians* totally disappeared in both contaminated systems. On the other hand, *A. minutissimum* showed significantly higher relative abundances at week 4 than at week 2 (around 12 % under low Cd and 25 % under high Cd), while *N. palea* and *E. minutum* proliferated under low Cd (35 %) and high Cd (54 %) respectively.

In experiment 2 (two weeks Cd exposure, **Figure 65 b**), main species compositions in the three systems did not differ significantly after two weeks of colonization (before Cd exposure), nor were they different from that in the control system of experiment 1 (**Figure 65 a**). After four weeks of colonization (after Cd exposure), species composition in the contaminated systems (red and black labels) showed little variation against the control. *N. palea* increased with contamination level under low and high Cd, and was significantly more abundant than in the control at week 4. Furthermore, under high Cd, *Thalassiosira pseudonana* was significantly more abundant than in the control, whereas *M. varians* was significantly lower.

Taxonomic differences between the diatom communities

Taxonomic differences between the diatom communities collected over the two experiments were investigated using principal component analysis (PCA), performed on the

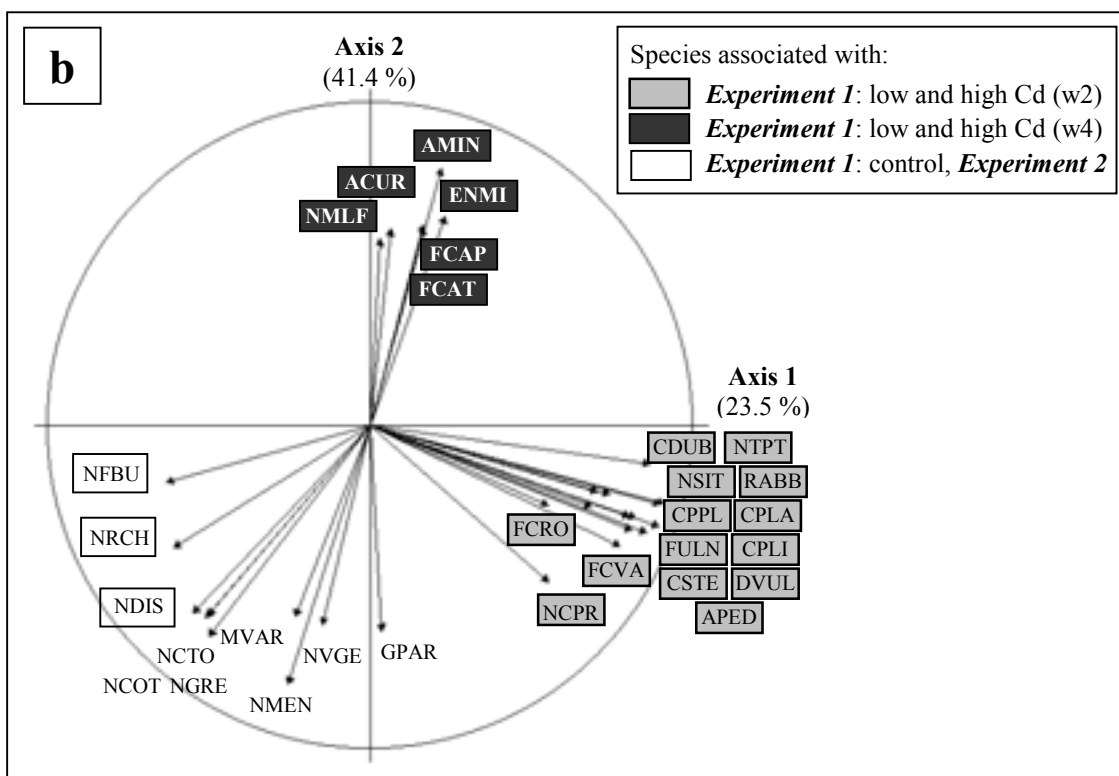
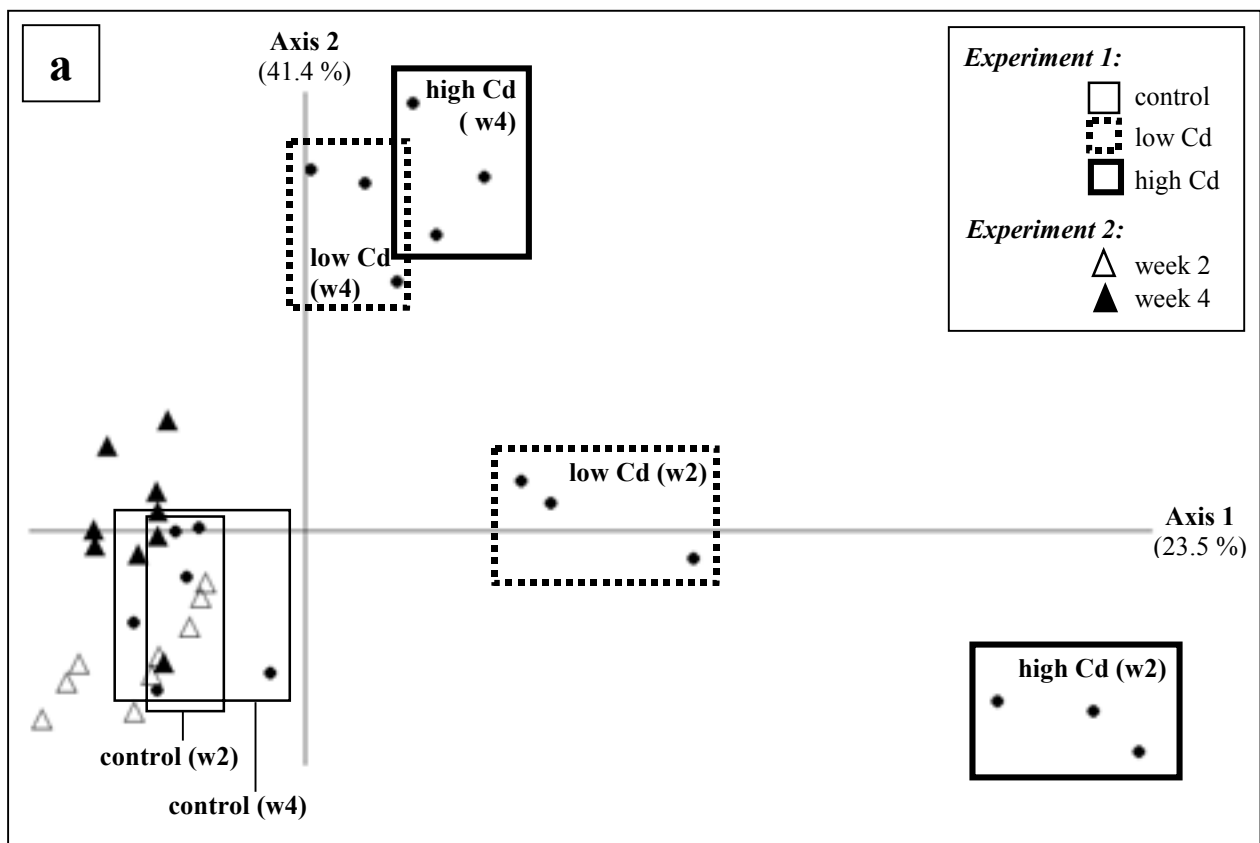


Figure 66: Principal component analysis based on the taxonomic composition of the diatom communities collected over the two experiments, in the control, low Cd and high Cd contaminated experimental systems. **(a):** Projection of the communities on the first two principal component axes. Sampling time is indicated in brackets for communities of experiment 1 (weeks 2 and 4 - 3 replicates per sampling time). **(b):** Projection on the correlation circle of the species with loading > 0.55 for one of the two axes (ACUR: *Achnanthes curtissima*, AMIN: *Achnantheidium minutissimum*, APED: *Amphora pediculus*, CDUB: *Cyclostephanos dubius*, CPLA: *Cocconeis placentula*, CPLI: *C. placentula* var. *lineata*, CPPL: *C. placentula* var. *pseudolineata*, CSTE: *Cyclotella stelligera*, DVUL: *Diatoma vulgare*, ENMI: *Encyonema minutum*, FCAP: *Fragilaria capucina*, FCAT: *F. capucina* fo. *teratogene*, FCVA: *F. capucina* var. *vaucheriae*, FCRO: *F. crotonensis*, FULN: *F. ulna*, GPAR: *Gomphonema parvulum*, MVAR: *Melosira varians*, NCPR: *Navicula capitatoradiata*, NCTO: *N. cryptotenelloides*, NGRE: *N. gregaria*, NMEN: *N. menisculus*, NMLF: *N. molestiformis*, NRCH: *N. reichardtiana*, NTPT: *N. tripunctata*, NVGE: *N. viridula* var. *germainii*, NDIS: *Nitzschia dissipata*, NFBU: *N. frustulum* var. *bulnheimiana*, NCOT: *N. constricta*, NSIT: *N. sinuata* var. *tabellaria*, RABB: *Rhoicosphenia abbreviata*).

relative abundances of the 55 species with the highest cumulative abundance when all the communities were considered (**Figure 66**).

PCA clearly separates the communities collected from experiment 1 (four weeks Cd exposure) according to their contamination exposure (control, low Cd or high Cd), and the Cd contaminated communities of experiment 1 according to their age (week 2 or 4). On the other hand, communities collected during experiment 2 (two weeks Cd exposure) were not obviously separated, and overlapped with the control communities of experiment 1.

Axis 1 (accounting for 23.5 % of total variation) separates contaminated communities of experiment 1 collected after 2 weeks [low Cd (w2), high Cd (w2)], on its positive side, from control communities of experiment 1 [control (w2), control (w4)] and communities collected from experiment 2, on its negative side (**Figure 66 a**). Separation along this axis results mainly from the greater relative abundance of 14 species (yellow labels, **Figure 66 b**) in the contaminated communities of experiment 1, which increased with contamination, whereas the control communities of experiment 1 and communities collected during experiment 2 were discriminated by higher proportions of 3 other species (blue labels), including *Nitzschia dissipata* (NDIS).

Axis 2 (41.4 % of total variation) separates contaminated communities of experiment 1 collected after 4 weeks [low Cd (w4), high Cd (w4)], with high positive axis 2 values, from all the other communities collected during the two experiments, with lower axis 2 values (**Figure 6A**). Later contaminated communities of experiment 1 [low Cd (w4), high Cd (w4)] showed comparable greater relative abundances of 6 species (orange labels, **Figure 66 b**), including *Achnantheidium minutissimum* (AMIN), *Encyonema minutum* (ENMI) and an abnormal form of the species *Fragilaria capucina* (called *F. capucina fo. teratogene*, FCAT), presenting bent or twisted valves. All the other communities were characterized by higher proportions of 8 species (no label and *N. dissipata*, NDIS). To a lesser extent, axis 2 also separates communities of experiment 2 (two weeks Cd exposure) collected after four weeks (black triangles, **Figure 66 a**), with slightly higher axis 2 values, from those collected after two weeks (white triangles).

A second PCA was performed on relative abundances of diatom species in the communities collected during experiment 2 only, in order to investigate the taxonomical differences between these communities, independent of the major variations observed within the communities collected during experiment 1. Nevertheless, this PCA also revealed no clear separation between the communities of experiment 2 according to the degree of contamination (data not shown).

DISCUSSION

Homogeneity of the physicochemical parameters and Cd exposure conditions in the experimental systems

Only minor variations of pH, temperature and dissolved oxygen concentration were observed in the experimental systems over the four week experimental period, with a good degree of homogeneity between all the systems (**Table 7**). Furthermore, these parameters lay values within the range of those measured in the River Lot during previous field studies (Gold C., unpublished data¹).

On the other hand, nutrient levels did not remain constant during the experimental period and differed between the systems, according to algal consumption and development. Lower nutrient concentrations (**Table 8**) were observed in the systems showing the higher diatom densities on substrata (**Figure 63**), i.e. the controls of both experiments, and systems to be contaminated of experiment 2 at weeks 2 and 4, and low Cd system of experiment 1 at week 4. Furthermore, when high diatom biomasses were found on substrata, periphytic mats also developed on all the light exposed surfaces of the experimental systems, with similar biomasses to the substrata. In spite of the differences in nutrient availability, conditions could be considered as non-limiting in all the systems, compared to the values measured in the River Lot: around 4 mg.L⁻¹ for nitrate, 8 mg.L⁻¹ for silica and < 0.1 mg.L⁻¹ for phosphate (Gold C., unpublished data¹).

Mean Cd concentrations in the contaminated systems of both experiments were estimated around 10 µg.L⁻¹ in low Cd systems, and a little above 100 µg.L⁻¹ in high Cd systems, during the exposure periods (**Figure 62**). The method used for Cd contamination of the water column therefore maintained an average contamination pressure close to the defined nominal concentration. The higher daily decreases in Cd concentrations observed in the contaminated systems of experiment 2 (two weeks Cd exposure) could be explained by a "wall effect", a thick diatom mat having developed in these systems on all the light exposed surfaces, offering many metal binding sites. Both Cd concentrations (low Cd and high Cd) were higher than the U.S. E.P.A. water quality criterion for the protection of aquatic life (< 2 µg Cd.L⁻¹) (U.S. E.P.A. 2001), but within the range of concentrations reported from contaminated rivers, which can be as much as 300 µg Cd.L⁻¹ (Ivorra *et al.* 1999; Rushforth *et al.* 1981).

¹ cf. Parties III et IV.

Structural characteristics of the diatom communities in the uncontaminated systems

Analysis of diatom communities collected from all the non-contaminated systems testifies to the great repeatability of the experimental systems. Indeed, the communities collected at week 2 in the control systems of the two experiments and in the systems to be contaminated of experiment 2 showed very good match in all the diatom community structure criteria (density, species richness, diversity, and species relative abundance), as well as the communities collected at week 4 in the control systems of the two experiments. Furthermore, the PCA set up with the relative abundances of the 55 highest species within diatom communities collected over the two experiments overlapped all the uncontaminated communities and clearly separated them from the contaminated ones, attesting to the similarity of their taxonomic composition (**Figure 66 a**).

Communities in all the uncontaminated systems could be considered mature at the end of week 2 under our experimental conditions, their characteristics remaining identical until the end of week 4 in the control systems of the two experiments. Uncontaminated communities were characterized by very high densities, around 150,000 cells.cm⁻² (**Figure 63**), and by high species richness and diversity (**Figure 64**). Nevertheless, two species showed greater development within these communities (**Figure 65**), the filament-forming *Melosira varians*, that grows preferentially in the upper layer of the biofilms, and *Nitzschia dissipata*, a motile algae that can actively move through the top layer (Biggs 1996), contributing to the formation of a thick, three-dimensional dark-brown layer on the substrata.

Such communities, developed after two weeks of colonization in the laboratory, showed very similar characteristics to communities collected after four weeks of colonization from the non-polluted site on the River Lot, in outdoor artificial streams set-up on the river bank (Gold C., unpublished data¹). Our experimental systems therefore showed a high degree of representativity in relation to field processes, with the faster diatom development in the laboratory presumably resulting from more favourable physicochemical conditions, such as higher nutrient levels and temperatures.

¹ cf. Partie III.

Effects of Cd exposure on the settlement and development of diatom communities

Results of experiment 1 (four weeks Cd exposure) support the hypothesis that Cd exposure disturbs diatom community development, both quantitatively and qualitatively, the perturbation increasing with the degree of contamination. Indeed, at the lower Cd concentration (around 10 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$), communities had very low densities after two weeks of colonization, but reached densities similar to the control after four weeks (**Figure 63 a**), owing to the development of three species (**Figure 65 a**): *Achnantheidium minutissimum*, *Encyonema minutum* and *Nitzschia palea*. On the other hand, at the higher contamination level (around 100 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$), densities remained very much lower than the control after four weeks of colonization (**Figure 63 a**), and communities were composed exclusively of only two species (**Figure 65 a**): *A. minutissimum* and *E. minutum*.

Therefore, the main species developed in the control - *Melosira varians* and *Nitzschia dissipata* - were strongly inhibited in the contaminated systems (**Figure 65 a**), preventing the development of a thick top layer over substrata. Thus exposure to the metal led to a different community architecture, confirming the hypothesis generated by field observations (Gold C., unpublished data¹), with biofilms under low Cd more addressed to substrata than in the control, and remaining very thin and patchy under high Cd. Nevertheless, metal exposure did not markedly affect the settlement of species at the beginning of substratum colonization, communities in the contaminated systems had comparable species richness and diversity to the control after two weeks of colonization (**Figure 64 a**, week 2). However, multiplication of many species was inhibited by Cd, and only a few species developed well in the contaminated systems, leading to later decreases in species richness and diversity (**Figure 64 a**, week 4), as has often been reported at metal polluted sites (Say 1978; Say and Whitton 1980; Deniseger *et al.* 1986; Genter and Lehman 2000).

Our results provide information on the behaviour of some diatoms under Cd exposure, and the resulting deductions about the metal tolerance or sensitivity of these species are in agreement with the findings of other authors. The high sensitivity of *M. varians*, often hypothesized according to field observations (Besch, Ricard and Cantin 1972; Say 1978; Monteiro, Oliveira and Vale 1995; Ivorra *et al.* 1999), was confirmed. Furthermore, Cd resistance of *N. palea* was demonstrated at the lower contamination level, and likewise the resistance of *A. minutissimum* and *E. minutum* at both Cd concentrations (10 and 100 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$), supporting the

¹ cf. Partie III.

high abundances of *N. palea* (Rushforth *et al.* 1981; Medley and Clements 1998) and *A. minutissimum* (Say 1978; Leland and Carter 1984; Deniseger *et al.* 1986; Ivorra *et al.* 1999) reported from metal contaminated environments. *Fragilaria capucina* var. *vaucheriae* (FCVA), already demonstrated to be metal tolerant by Medley and Clements (1998), had higher relative abundances in both contaminated systems compared to the control (**Figure 66**), although it was less important within communities, like *Fragilaria crotonensis* (FCRO), often described from metal polluted sites (Leland and Carter 1984; Besch *et al.* 1972).

Development of abnormal forms of diatom species in the contaminated systems supports another hypothesis generated by field observations, i.e. that metal stress can lead to the formation of aberrant diatoms (Besch *et al.* 1972; McFarland, Hill and Willingham 1997; Dickman 1998). Abnormal frustules of *Fragilaria capucina* (called *F. capucina* fo. *teratogene*) were found in the two contaminated systems of experiment 1 (four weeks Cd exposure), with proportions around 0.5 % and 1.5 % under low and high Cd respectively after four weeks of colonization, whereas no such individuals were observed in the control communities. It has been suggested that metals impair normal membrane function and reduce silicic acid uptake and amino acid synthesis (Fisher and Jones 1981), leading to abnormalities during diatom silica cell wall formation.

Cd perturbations within mature diatom communities and the role of the developed organic matrix

Results of experiment 2 (two weeks Cd exposure) reveal limited effects of Cd on the structure of mature diatom communities. Indeed, after two weeks of Cd exposure, little variation appeared in main species composition, with small decreases in species richness and diversity (**Figure 64 b**), whereas diatom density (**Figure 63 b**) and overall taxonomic composition (**Figure 66**) remained identical. The structural perturbations induced by Cd within mature communities were therefore less pronounced than those induced by this metal during community settlement and development.

These results support the hypothesis of Ivorra *et al.* (2000 a) that the organic matrix of developed biofilms plays a protective role against metal stress. The extracellular polymeric substances of algae and bacteria present in the biofilms (Freeman and Lock 1995), that offer high metal complexation capacities, certainly reduce bioavailability and toxicity of metal to algal cells embedded in the developed community. Using autoradiographic techniques, Rose and Cushing (1970) have demonstrated that Zn penetration was restricted to the upper layer of

biofilms. This protective effect of the biofilm can explain why species such as *Nitzschia dissipata*, demonstrated as sensitive to Cd according to results of experiment 1, did not decrease within the developed communities after Cd exposure, and why *Nitzschia palea* and *Thalassiosira pseudonana*, demonstrated as sensitive to the higher Cd level (around 100 µg Cd.L⁻¹) in experiment 1, were found to increase slightly within developed communities exposed to a similar Cd level.

On the other hand, the filamentous *M. varians*, forming the top layer of developed communities, was less protected from metal stress and was observed to decrease significantly after exposure to the higher Cd level. Decreases in *M. varians* have also been reported within intact river communities brought back from the field and exposed to metal in the laboratory (Medley and Clements 1998; Ivorra *et al.* 2000 a). Nevertheless, at the lower Cd concentration (around 10 µg Cd.L⁻¹), *M. varians* remained at the same abundance as in the control, whereas it was demonstrated as sensitive to this Cd concentration in experiment 1.

In addition to a protective role against the effects of metal stress, the developed organic matrix could also lead to the underestimation of the perturbations induced by Cd within developed communities. Indeed, during community settlement and development, only the individuals that developed well on the substrata could be registered, whereas after metal exposure of developed communities, the diatoms which were dead or in a poor state may remain embedded in the organic matrix, and thus prevent estimation of the real structural perturbations induced by Cd. Furthermore, in our laboratory models, the low current velocity also slowed down the detection of community changes, because it did not stimulate the detachment of dead cells from substrata. This effect of current velocity could explain why metal perturbation within developed communities in our experimental systems were low compared to field results, which have reported greater structural changes within diatom communities grown from a reference site and transferred to a polluted site, for similar metal exposure durations but under higher current velocities (Ivorra *et al.* 1999; Gold C., unpublished data¹).

¹ cf. Partie IV.

CONCLUSION

Results from these experiments, using indoor artificial streams to study the effects of Cd on periphytic diatom communities, demonstrated the value of the experimental models, showing low variability between replicates and a high degree of representativity toward field processes. Cd contamination had a strong effect on the settlement and development of diatom communities, leading to clear changes in community architecture. Perturbation of developed communities was much less pronounced, possibly linked to the protective role of the organic matrix of developed biofilms against metal stress. In any case, because more time is necessary to detect marked changes within developed communities, longer experiments have to be carried out to determine whether mature communities will change markedly after longer exposure, to resemble communities grown entirely under Cd contamination.

The presence of abnormal diatom frustules was demonstrated under Cd exposure, but the very low abundances of these deformed cells within communities make their use as an indicator of metal pollution difficult for routine monitoring. On the other hand, information about metal sensitivity or tolerance of some diatom species given by our experiments are in agreement with many field observations, and attest the potential validity of the periphytic diatom communities as indicators of metal pollution. Nevertheless, more information is still required about the tolerances of the species. Laboratory experiments using smaller experimental systems are currently being conducted, with monospecific diatom strains, in isolation or in combination, exposed to different levels of Cd or metal mixtures (Cd/Zn), with the aim of confirming their tolerance or sensitivity to metals.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministère de l'Environnement, Agence de l'Eau Adour-Garonne, Aquitaine Région, Feder Aquitaine and Cemagref, within the Groupement d'Intérêt Scientifique Ecologie de l'Eau du Bassin Adour Garonne. We thank Henry Bouillard and Bruno Etcheverria, from the LEESA, for their excellent technical assistance for conception of the experimental systems, and Hilary Koziol, from the department of Foreign Languages (University Bordeaux 2), for improvements to the narrative style of the manuscript.

REFERENCES

- AFNOR (2001) Association française de normalisation. Web site: <http://www.afnor.fr>
- Andres S., Baudrimont M., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C., and Boudou A. (1999) Field transportation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 (11), 2462-2471.
- Besch W.K., Ricard M. and Cantin R. (1972) Benthic diatoms as indicators of mining pollution in the Northwest Miramichi River System, New Brunswick, Canada. *International Revue of Hydrobiology*, 57(1), 39-74.
- Biggs B.J.F. (1996) Patterns in benthic algae of streams. In: Algal ecology of freshwater benthic ecosystems, Aquatic Ecology Series, Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 31-56.
- Deniseger J., Austin A. and Lucey W.P. (1986) Periphyton communities in a pristine mountain stream above and below metal mining operations. *Freshwater Biology*, 16, 209-218.
- Descy J. and Coste M. (1991) A test of methods for assessing water quality based on diatoms. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 24, 2112-2116.
- Dickman M.D. (1998) Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environment International*, 24(7), 749-759.
- Fisher N.S. and Jones G.J. (1981) Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 51, 37-56.
- Freeman C. and Lock M.A. (1995) The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnology Oceanography*, 40(2), 273-278.
- Genter R.B. and Lehman R.M. (2000) Metal toxicity inferred from algal population density, heterotrophic substrate use, and fatty acid profile in a small stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(4), 869-878.
- Ghosh M. and Gaur J.P. (1998) Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. *Aquatic Botany*, 60, 1-10.
- Ivorra N., Hettelaar J., Tubbing G.M.J., Kraak M.H.S., Sabater S. and Admiraal W. (1999) Translocation of microbenthic assemblages used for *in situ* analysis of metal pollution in rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 19-28.
- Ivorra N., Bremer S., Guasch H., Kraak M.H.S. and Admiraal W. (2000 a) Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(5), 1332-1339.

- Kelly M.G. and Whitton B.A. (1995) The trophic diatom index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *Journal of Applied Phycology*, 7, 433-444.
- Krammer K. and Lange-Bertalot H. (1986) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 1. Naviculaceae. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer K. and Lange-Bertalot H. (1988) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer K. and Lange-Bertalot H. (1991a) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer K. and Lange-Bertalot H. (1991b) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Bacillariophyceae. Teil 4. Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu *Navicula* (Lineolatae) und *Gomphonema*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Leland H.V. and Carter J.L. (1984) Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream. *Freshwater Biology*, 14, 281-296.
- Lowe R.L. and Pan Y. (1996) Benthic algal communities as biological monitors. In: Algal ecology of freshwater benthic ecosystems, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 705-739.
- McCormick P.V. and Cairns J. Jr (1994) Algae as indicators of environmental change. *Journal of Applied Phycology*, 6, 509-526.
- McFarland B.H., Hill B.H. and Willingham W.T. (1997) Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. *Journal of Freshwater Ecology*, 12(1), 141-149.
- Medley C.N. and Clements W.H. (1998) Responses of diatom communities to heavy metals in streams: the influence of longitudinal variation. *Ecological Applications*, 8(3), 631-644.
- Monteiro M.T., Oliveira R. and Vale C. (1995) Metal stress on the plankton communities of Sado River (Portugal). *Water Research*, 29(2), 695-701.
Patrick R. (1971) The effects of increasing light and temperature on the structure of diatom communities. Limnology Oceanography, 16, 405-421.
- Rose F.L. and Cushing C.E. (1970). Periphyton: autoradiography of zinc-65 adsorption. *Science*, 68, 576-577.
- Rosemond A.D., Mulholland P.J. and Brawley S.H. (2000) Seasonally shifting limitation of stream periphyton: response of algal populations and assemblage biomass and productivity to variation in light, nutrients and herbivores. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences*, 57, 66-75.

- Rushforth S.R., Brotherson J.D., Fungladda N. and Evenson W.E. (1981) The effect of dissolved heavy metals on attached diatoms in the Uintah Basin of Utah, U.S.A. *Hydrobiologia*, 83, 313-323.
- Say P.J. (1978) The Riou-Mort, a tributary to the river Lot polluted by heavy metals. I. Preliminary observations on the chemistry and benthic algae. *Annals of Limnology*, 14(1-2), 113-131.
- Say P.J. and Whitton B.A. (1980) Changes in flora down a stream showing a zinc gradient. *Hydrobiologia*, 76, 255-262.
- Stauber J.L. and Florence T.M. (1989) The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and to the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Water Research*, 23(7), 907-911.
- U.S. E.P.A. (2001) Water pollution legal aspects. Web site: <http://www.epa.gov>
- Whitton B.A. (1980) River Ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne.

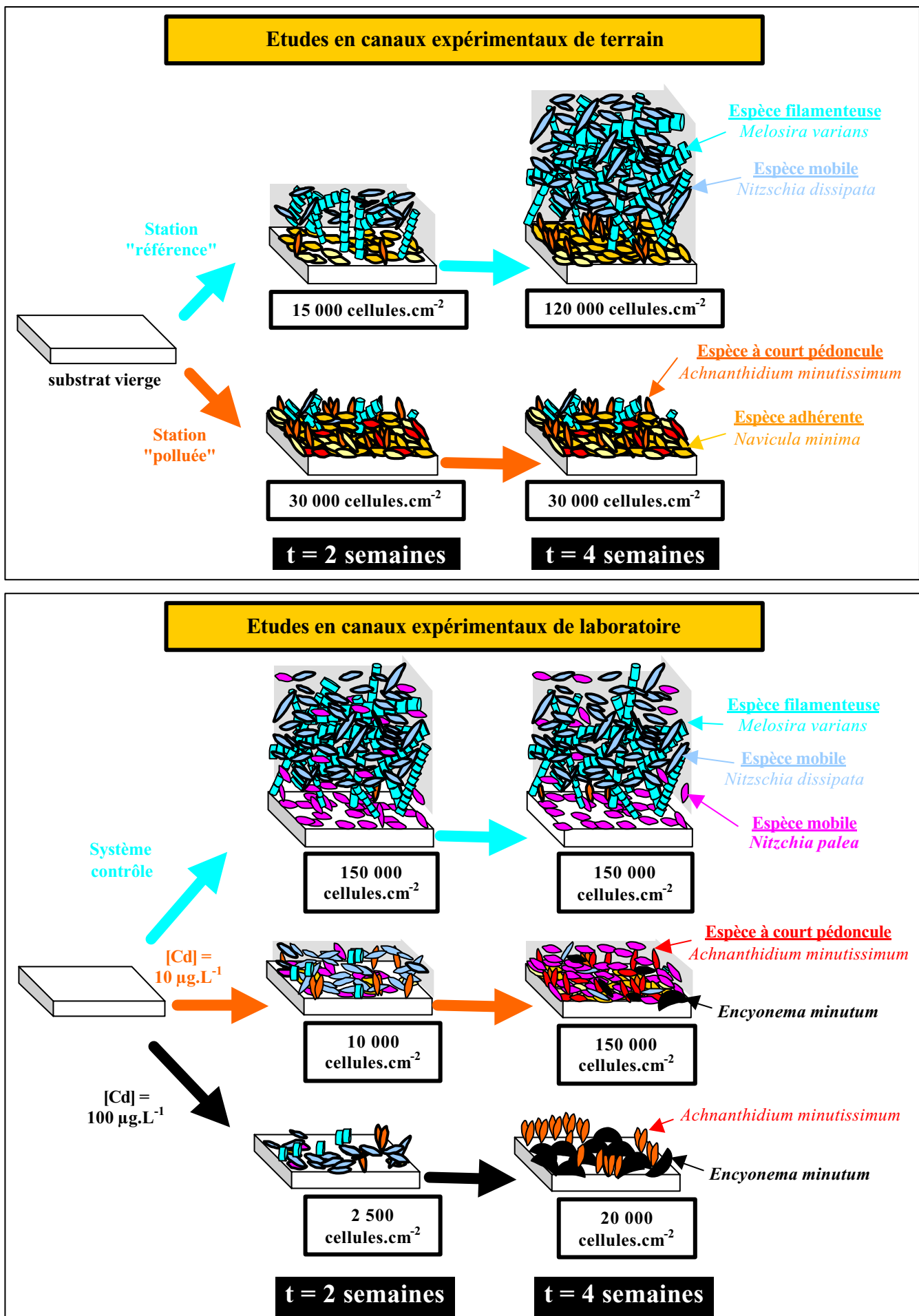


Figure 67 : Représentation schématique de l'architecture des communautés de diatomées développées sur les substrats artificiels vierges :

- dans les canaux de terrain placés sur la station "référence" et la station "polluée", lors des études *in situ* menées le long du gradient de pollution polymétallique (Cd/Zn) de la rivière Lot,
- dans les canaux expérimentaux de laboratoire, soumis à différents niveaux de contamination par le cadmium (contrôle, 10 µg Cd.L⁻¹, 100 µg Cd.L⁻¹).

C- COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS *IN SITU* ET EN LABORATOIRE

C-1. REPRESENTATIVITE DES SYSTEMES EXPERIMENTAUX DE LABORATOIRE

Les communautés de diatomées périphtiques qui se sont développées dans les systèmes expérimentaux de laboratoire, dans des conditions très simplifiées par rapport aux conditions du milieu naturel, ont présenté des caractéristiques comparables à celles observées dans les canaux de terrain, disposés sur la berge des cours d'eau lors de notre première série d'études *in situ*¹ (**Figure 67**). En absence de contamination, des densités de l'ordre de 150 000 cellules.cm⁻² ont été dénombrées sur les substrats artificiels en laboratoire, après deux semaines de colonisation, équivalentes à celles observées dans les canaux placés sur la station "référence" de la rivière Lot, après quatre semaines (120 000 cellules.cm⁻²). En ce qui concerne la composition spécifique de ces communautés, une prédominance des espèces constitutives de la couche externe des biofilms, comme *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata*, a été marquée dès la deuxième semaine de colonisation en laboratoire (ces espèces représentant 60 % des communautés à elles-deux), comparable à celle observée dans les canaux de la station "référence" après quatre semaines (70 % à elles deux).

Les systèmes expérimentaux que nous avons conçus en laboratoire présentent donc un **bon niveau de représentativité** par rapport aux conditions du milieu naturel, le développement plus rapide des communautés observé en laboratoire pouvant être lié à des conditions expérimentales plus favorables à la croissance algale (concentrations en nutriments et températures plus élevées par exemple). Les études en conditions contrôlées s'avèrent donc être de bons outils méthodologiques pour aider à l'interprétation des observations faites précédemment sur le terrain.

¹ cf. Partie III-B.

C-2. EFFETS DE LA POLLUTION METALLIQUE SUR L'ARCHITECTURE GLOBALE DES COMMUNAUTES PERIPHYTIQUES

C-2.1. Une réduction marquée du développement en trois dimensions des communautés exposées à la pollution dès la phase initiale de leur développement

Les résultats de la première étude menée en laboratoire, qui a permis de suivre en conditions contrôlées le développement des communautés de diatomées périphytiques sur des substrats artificiels vierges, avec différents niveaux de contamination par le Cd, confirment l'hypothèse que nous avons émise lors des études de terrain dans des canaux expérimentaux¹, selon laquelle la pollution métallique, et le Cd en particulier, pourrait induire des perturbations marquées au niveau de l'**architecture en trois dimensions** des communautés de diatomées périphytiques. Un fort accroissement en épaisseur des biofilms a été observé dans les canaux de laboratoire en absence de contamination, en raison du grand développement d'espèces comme *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata*, comme nous l'avions observé précédemment dans les canaux de terrain (**Figure 67**). En revanche, les communautés "contaminées" par le Cd sont restées très fines sur les substrats, constituées majoritairement d'espèces adhérentes ou étroitement rattachées au support, comme *Achnantheidium minutissimum*.

Notons que ces perturbations de la structure des communautés liées au Cd n'ont eu des répercussions négatives sur **la richesse et la diversité spécifiques** que pour le plus fort niveau de contamination étudié en laboratoire (100 µg Cd.L⁻¹). Ceci explique pourquoi les décroissances de ces deux indices, rapportées par de nombreux auteurs sur des sites naturels contaminés par de fortes concentrations en métaux (Say 1978, Say and Whitton 1980, Lampkin and Sommerfeld 1982, Roch *et al.* 1985, Denieseger *et al.* 1986, Crossey and La Point 1988, Sabater 2000), n'ont pas été retrouvées au niveau de notre station "polluée" sur le Riou-Mort, qui a présenté des concentrations en Cd et en Zn relativement faibles (< 15 µg Cd.L⁻¹ et 700 µg Zn.L⁻¹).

Rappelons que lors des études de terrain en conditions non contrôlées², des **différences architecturales** beaucoup moins prononcées avaient été observées entre les communautés des stations R et P, en raison certainement des **effets érosifs du courant**.

¹ cf. Partie III.

² cf. Partie IV.

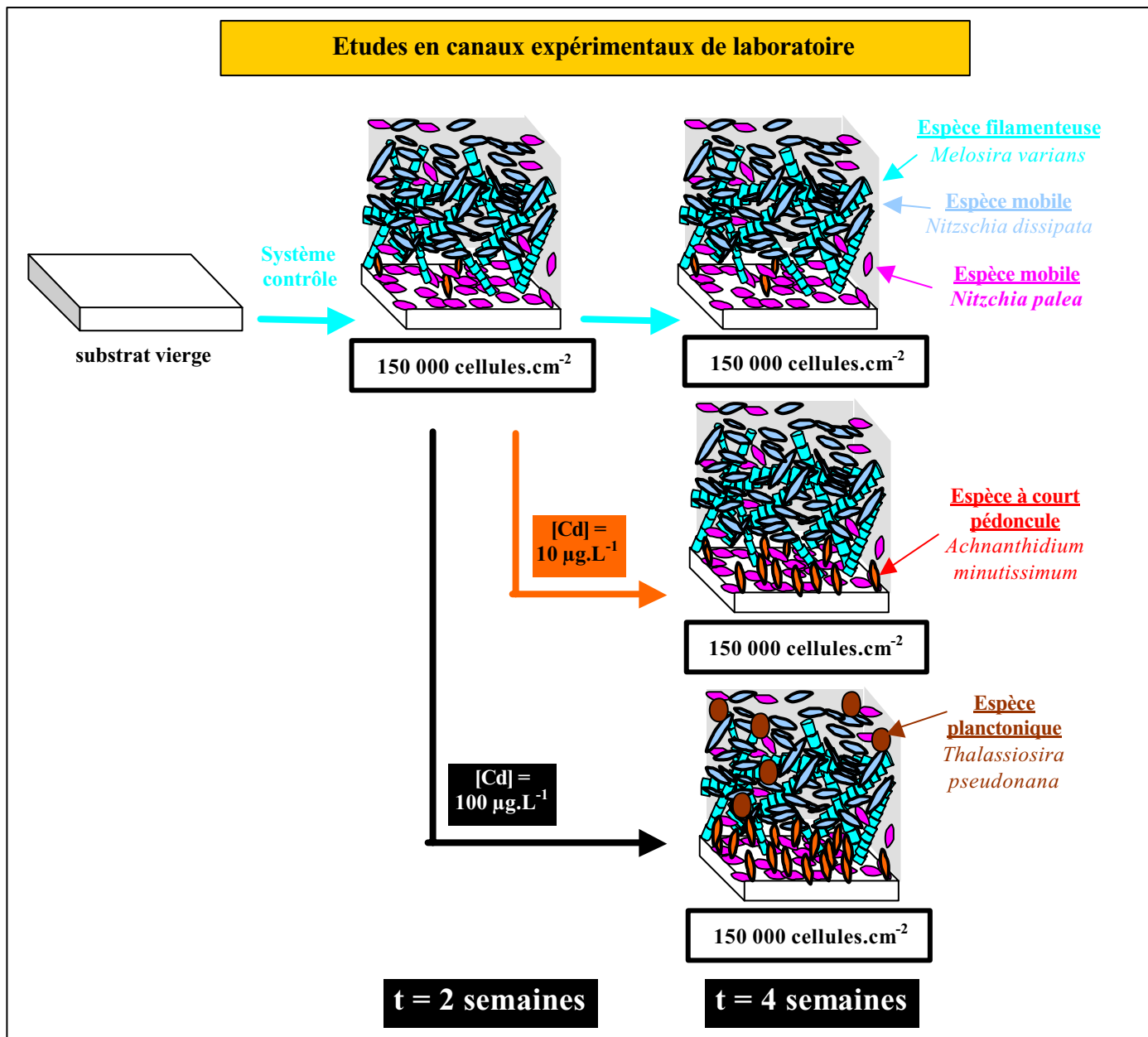


Figure 68 : Représentation schématique de l'évolution des communautés de diatomées développées sur les substrats artificiels vierges, dans les systèmes expérimentaux de laboratoire, après leur exposition à la contamination par le cadmium (Cd).

La contamination par le Cd entraîne donc des perturbations architecturales marquées lors du développement des communautés de diatomées périphytiques sur des substrats artificiels vierges. La détection de ces perturbations semble toujours possible, même dans les conditions complexes du milieu naturel où les variations de nombreux facteurs environnementaux interagissent avec celles des métaux. Des effets nettement moins accentués doivent cependant être attendus dans le cas où de fortes vitesses de courant ralentiraient le développement global des communautés.

C-2.2. Des perturbations plus progressives au niveau des communautés exposées à la pollution à un stade avancé de développement, qui pourraient être liées au rôle protecteur et à l'effet de "piégeage" exercés par la matrice périphytique

Les résultats de la deuxième étude menée en laboratoire, qui a permis de suivre l'évolution de communautés déjà développées sur les substrats au moment de leur exposition au Cd, mettent en évidence des **effets beaucoup moins marqués** de ce métal sur l'architecture des biofilms mûres (**Figure 68**). Rappelons qu'au cours des études de terrain en conditions non contrôlées¹, des perturbations structurales plus progressives étaient également apparues au niveau de communautés exposées à la pollution à un stade avancé de développement (maturité) (**Figure 57**).

Ces résultats de terrain et de laboratoire confortent l'hypothèse émise par plusieurs auteurs (Lock *et al.* 1984, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a), selon laquelle la matrice périphytique, qui possède de nombreux sites de fixation des métaux, pourrait réduire la biodisponibilité et la toxicité du Cd à l'égard des organismes périphytiques. Elle exercerait ainsi un **rôle protecteur** vis-à-vis de la pollution métallique.

Notons que cette matrice organique des communautés mûres peut également exercer un **effet de "piégeage"** des diatomées, conduisant à sous-estimer les effets réels du Cd sur la structure des communautés. En effet, le protocole d'analyse de la structure des communautés que nous avons utilisé, basé sur l'énumération microscopique des diatomées après un traitement chimique permettant de débarrasser les frustules de leur contenu organique, ne permet pas de distinguer les cellules vivantes des cellules affectées par le métal (mortes ou en mauvais état), qui sont restées imbriquées dans la matrice périphytique.

¹ cf. Partie IV.

	ETUDES <i>IN SITU</i> EN CONDITIONS SEMI-CONTROLEES	ETUDES <i>IN SITU</i> EN CONDITIONS NON CONTROLEES	ETUDES EN LABORATOIRE EN CONDITIONS CONTROLEES
Abondances relatives > en l'absence de pollution métallique	<p>MVAR <i>Melosira varians</i></p> <p>NDIS <i>Nitzschia dissipata</i></p>	<p>ACTT <i>Achnanthes catenata</i> AFOR <i>Asterionella Formosa</i> AMIN <i>Ach. minutissimum</i> CDUB <i>Cyclostephanos dubius</i> CSTE <i>Cyclotella stelligera</i> CTUM <i>Cymbella tumida</i> FCAP <i>Fragilaria capucina</i> GMMI <i>Gomphoneis minuta</i> GNOD <i>Gyrosigma nodiferum</i> GYAT <i>Gyrosigma attenuatum</i></p> <p>NCPR <i>Navicula capitatoradiata</i> NCRY <i>Navicula cryptocephala</i> NCTE <i>Navicula cryptotenella</i> NRCH <i>Navicula reichardtiana</i> NRHY <i>Navicula rhychocephala</i> NDIS <i>Nitzschia dissipata</i></p>	<p>MVAR <i>Melosira varians</i></p> <p>NRCH <i>Navicula reichardtiana</i></p> <p>NDIS <i>Nitzschia dissipata</i> NFBU <i>Nitzschia frustulum</i> var. <i>bulnheimiana</i></p>
Abondances relatives > en présence de pollution métallique	<p>AAMB <i>Aulacoseira ambigua</i></p> <p>AFOR <i>Asterionella formosa</i> ALFR <i>Ach. lanceolata</i> ssp. <i>frequentissima</i> AMIN <i>Ach. minutissimum</i></p> <p>CDUB <i>Cyclostephanos dubius</i> CINV <i>Cyclostephanos invisitatus</i> CMEN <i>Cyclotella meneghiniana</i> CPLA <i>Cocconeis placentula</i></p> <p>CPLE <i>C. placentula</i> var. <i>euglypta</i></p> <p>FULN <i>Fragilaria ulna</i> GPAR <i>Gomphonema parvulum</i></p> <p>NLAN <i>Navicula lanceolata</i> NMIN <i>Navicula minima</i></p> <p>NLIN <i>Nitzschia linearis</i> NPAL <i>Nitzschia palea</i> PMIC <i>Pinnularia microstauron</i></p> <p>RABB <i>Rhoicosphenia abbreviata</i> SANG <i>Surirella angusta</i> SBRE <i>Surirella brebissonii</i> FCGT <u><i>Fragilaria capucina</i></u> <u>var. <i>gracilis</i> fo. <i>teratogene</i></u></p>	<p>ALFR <i>Ach. lanceolata</i> ssp. <i>frequentissima</i></p> <p>FCRO <i>Fragilaria crotonensis</i> GPAR <i>Gomphonema parvulum</i></p> <p>NMIN <i>Navicula minima</i> NLIN <i>Nitzschia linearis</i> PMIC <i>Pinnularia microstauron</i> PGLO <i>Pinnularia globiceps</i></p> <p>SANG <i>Surirella angusta</i></p>	<p>ACUR <i>Achnanthes curtissima</i></p> <p>AMIN <i>Ach. minutissimum</i> APED <i>Amphora pediculus</i> CDUB <i>Cyclostephanos dubius</i></p> <p>CPLA <i>Cocconeis placentula</i> CPLI <i>C. placentula</i> var. <i>lineata</i></p> <p>CSTE <i>Cyclotella stelligera</i> DVUL <i>Diatoma vulgare</i> ENMI <i>Encyonema minutum</i> FCAP <i>Fragilaria capucina</i> FCRO <i>Fragilaria crotonensis</i> FULN <i>Fragilaria ulna</i></p> <p>NCPR <i>Navicula capitatoradiata</i></p> <p>NMLF <i>Navicula molestiformis</i> NPAL <i>Nitzschia palea</i></p> <p>RABB <i>Rhoicosphenia abbreviata</i></p> <p>FCAT <u><i>Fragilaria capucina</i></u> <u>fo. <i>teratogene</i></u></p>

Figure 69 : Liste des Diatomées ayant présenté des abondances relatives supérieures en l'absence ou en présence de pollution métallique, lors des études *in situ* menées le long du gradient de pollution polymétallique (Cd/Zn) de la rivière Lot, en conditions semi-contrôlées et en conditions non contrôlées, et lors des études en laboratoire de la contamination par le cadmium de communautés du Lot.

Des perturbations structurales nettement moins accentuées doivent donc être attendues dans le cas d'une contamination métallique soudaine, au niveau de communautés présentant un stade de développement bien avancé sur les substrats.

C-3. HYPOTHESES CONCERNANT LES NIVEAUX DE TOLERANCE A LA POLLUTION METALLIQUE DE DIFFERENTES ESPECES DE DIATOMEES

Les résultats des études en laboratoire permettent de conforter certaines des hypothèses émises d'après les résultats des études de terrain, concernant le **niveau de tolérance au Cd de plusieurs espèces de diatomées (Figure 69)**. Ainsi *M. varians* et *N. dissipata*, dont les abondances relatives ont diminué avec le niveau de pollution métallique lors des études *in situ* et en laboratoire, semblent présenter une grande sensibilité au Cd. En revanche, des espèces comme *Cyclostephanos dubius*, *Nitzschia palea*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Cocconeis placentula* ou *Fragilaria crotonensis*, qui ont présenté des abondances relatives croissantes avec le niveau de pollution sur le terrain (**Figures 38 et 55**) et en laboratoire (**Figure 66**), sont tolérantes au Cd, pour les niveaux de pollution de nos expériences. Il en va de même pour *Encyonema minutum*, qui a montré une grande tolérance au Cd au cours des études en laboratoire (**Figure 66**), même si elle n'a pas été remarquée lors des études *in situ*. L'apparition de frustules déformés en présence de contaminants métalliques, observée sur le terrain, a été confirmée dans les conditions contrôlées du laboratoire, mais les très faibles abondances relatives de ces formes anormales au sein des communautés rendent difficile leur utilisation en tant qu'indicateur de la pollution métallique.

Rappelons que si les études de terrain ont permis de prendre en compte les effets à long-terme de la pollution, sur des souches de diatomées "résidentes" au sein des stations polluées, exposées à la pollution depuis longtemps et qui ont pu développer des mécanismes d'adaptation, les études en laboratoire ont été effectuées sur des communautés originaires de la station "référence" du Lot, qui n'avaient jamais été exposées à des concentrations métalliques supérieures au bruit de fond "géochimique" caractéristique des hydrosystèmes de cette zone géographique¹. Les espèces qui ont présenté une forte capacité de développement dans les canaux de laboratoire contaminés par du Cd, comme *Encyonema minutum* et *Nitzschia palea*, sont donc des espèces qui possèdent "naturellement" une bonne tolérance aux métaux, ou qui ont pu développer des mécanismes d'adaptation au cours des quatre semaines

¹ cf. Partie II-A-2.2.

d'expérience, ce qui paraît possible étant donnée la faible durée du cycle de développement des diatomées (quelques heures à quelques jours) (Baars 1983).

Les résultats des approches expérimentales menées *in situ* et en laboratoire ont donc globalement présenté une grande complémentarité. Toutefois, des comportements opposés vis-à-vis de la pollution métallique ont été observés entre les différentes études pour certaines espèces. *Achnanthydium minutissimum*, par exemple, a montré des abondances relatives augmentant avec le niveau de pollution dans les canaux de laboratoire (**Figures 65 et 66**), ainsi que dans les canaux de terrain après deux semaines de colonisation (**Figure 39**), alors que cette espèce présentait des abondances supérieures sur la station "référence" durant les études de terrain en conditions non contrôlées (**Figure 55**). Ce comportement variable d'*A. minutissimum* peut être lié aux différences environnementales observées entre ces études (température, vitesse du courant, etc.).

C-4. DEFINITION DES RECHERCHES SUIVANTES

Les études de communautés menées en laboratoire, visant à appréhender les effets de la contamination par le Cd, ont permis de valider les hypothèses issues de nos études *in situ*, concernant les effets de la pollution métallique sur la **structure globale des communautés**. Toutefois, la réalisation de travaux en laboratoire prenant en compte le caractère polymétallique de la contamination permettrait d'approfondir la comparaison avec les résultats de terrain, le gradient de pollution de la rivière Lot étant basé sur des rejets concomitants de plusieurs métaux, le cadmium et le zinc étant, d'après les concentrations mesurées dans la colonne d'eau, les éléments les plus importants. Notons que l'étude des effets de synergie ou d'antagonisme du Cd et du Zn se révèle particulièrement intéressante, le premier étant généralement considéré comme un métal toxique¹, alors que le deuxième est un oligo-élément essentiel à la croissance algale, pouvant toutefois exercer des effets néfastes au-delà d'une valeur seuil, variable selon les espèces et les conditions d'exposition.

En ce qui concerne les **niveaux de tolérance aux métaux des espèces** de diatomées, les études de communautés ne permettent pas d'émettre de conclusion définitive. En effet, lors de l'exposition à un contaminant, l'abondance d'une population au sein de la communauté peut être modifiée en raison des effets directs du contaminant au niveau cellulaire (réduction des

¹ bien que les travaux de Lee *et al.* (1995) aient démontré que ce métal pouvait restaurer la croissance algale dans un milieu marin carencé en Zn.

populations sensibles), mais également en raison d'effets indirects dus aux interactions interspécifiques. Pour évaluer le niveau de tolérance "réel" aux métaux des différentes espèces de diatomées, la réalisation d'**études au niveau des populations**, permettant de s'affranchir des interactions entre espèces existant au sein des communautés, s'avère nécessaire.

*Ainsi, nous avons initié une **étude monospécifique** en laboratoire, à partir d'une culture de la diatomée périphytique *Achnantheidium minutissimum*, afin d'évaluer les effets de la contamination par le cadmium. Le protocole et les résultats de cette étude, qui revêt un caractère exploratoire, sont exposés dans la partie suivante.*

PARTIE VI

**ETUDE MONOSPECIFIQUE EN LABORATOIRE
DES EFFETS DU CADMIUM SUR LA CROISSANCE**

D'Achnantheidium minutissimum

SOMMAIRE DE LA PARTIE VI

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE	140
A-1. DESCRIPTION DES SYSTEMES EXPERIMENTAUX ET CONTROLE DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES	141
<i>A-1.1. Description de l'unité expérimentale (UE)</i>	141
<i>A-1.2. Régulation des facteurs physico-chimiques</i>	142
A-2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	143
B- RESULTATS ET DISCUSSION	144
B-1. CONDITIONS DE CONTAMINATION	144
B-2. CROISSANCE D' <i>A. minutissimum</i>	145
C- CONCLUSION	147

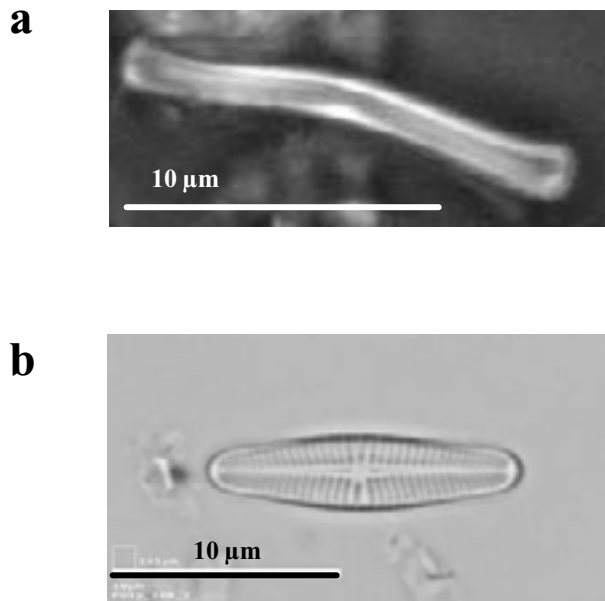


Figure 70 : Photographies de frustules de l'espèce *Achnantheidium minutissimum*
d'après des observations au microscope photonique
(a) en vue connective (source : <http://www.staff.ncl.ac.uk/r.j.telford/diatoms>)
(b) en vue valvaire (source : <http://www.rbge.org.uk/ADIAC>).

A- ELEMENTS DE METHODOLOGIE

Suite aux études *in situ* et en laboratoire menées pour évaluer les effets de la pollution métallique à l'échelle des communautés de diatomées périphytiques, nous avons initié des études au niveau des **populations**.

Les études monospécifiques offrent de larges perspectives de recherche, puisqu'elles représentent le moyen d'évaluer le niveau de tolérance "réel" aux métaux d'espèces étudiées séparément, une fois soustraites à l'influence des relations interspécifiques existant au sein des communautés, et dans les conditions contrôlées du laboratoire. Pourtant, peu d'études ont été effectuées sur des souches isolées de diatomées, en particulier sur les espèces périphytiques, en raison des difficultés à les maintenir en culture au laboratoire. En outre, les quelques tests de toxicité réalisés jusqu'à présent ont été effectués dans des conditions expérimentales très favorables (température, lumière, sels nutritifs), éloignées des conditions du milieu naturel, et sur des populations d'algues périphytiques cultivées en suspension, rendant l'extrapolation des résultats incertaine (Wong *et al.* 1982, Takamura *et al.* 1989). Les facteurs régissant les mécanismes de toxicité des métaux sur les cellules algales peuvent en effet être considérés comme très différents suivant que ces cellules se trouvent en suspension dans le milieu ou qu'elles sont imbriquées dans des biofilms périphytiques.

Nous avons étudié les effets du cadmium (Cd) sur des populations de diatomées périphytiques dans des conditions expérimentales offrant un plus grand degré de représentativité par rapport aux conditions naturelles, et en suivant la croissance de ces algues au cours des phases de colonisation de substrats artificiels, dans des systèmes expérimentaux de laboratoire recréant une circulation d'eau simulant les conditions en milieu lotique.

L'expérience abordée dans les paragraphes suivants a été réalisée avec l'espèce *Achnantheidium minutissimum*, qui a présenté des comportements différents vis-à-vis de la pollution métallique au cours des études que nous avons menées sur le terrain et en laboratoire à l'échelle des communautés¹. Cette espèce a en effet présenté des abondances augmentant significativement avec le niveau de pollution dans les canaux artificiels de laboratoire (**Figures 65 et 66**) et dans les canaux de terrain (**Figure 39**), mais elle a été caractérisée par des valeurs supérieures sur la station "référence" durant la deuxième série

¹ cf. Parties III, IV et V.

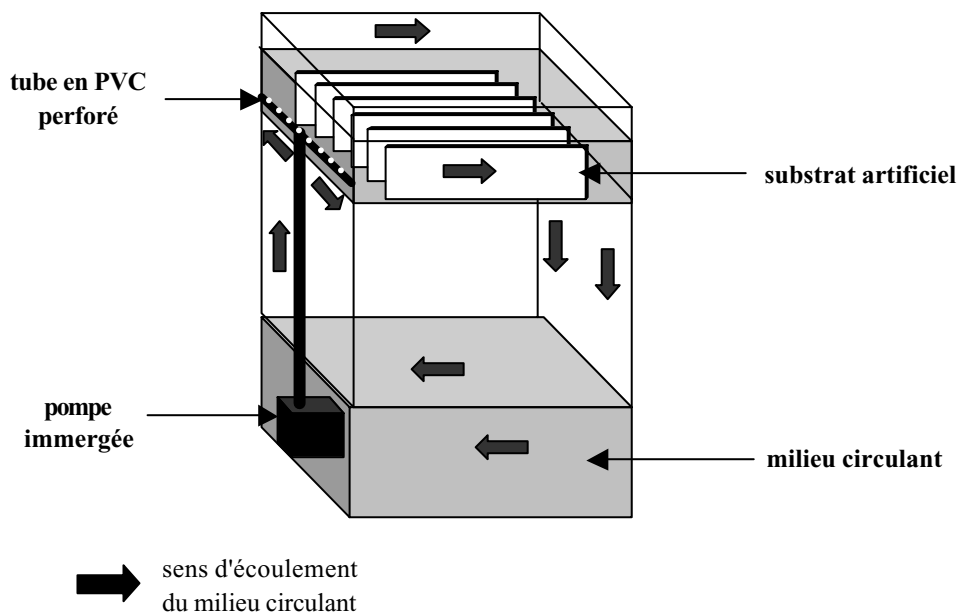


Figure 71 : Schéma de l'unité expérimentale (UE) (12 x 12 x 30 cm) contenant 6 substrats artificiels en verre (7,6 x 2,6 cm).

milieu de base	concentration (mg.L ⁻¹)	oligoéléments	concentration (mg.L ⁻¹)	nutriments	concentration (mg.L ⁻¹)
FeSO ₄	1	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,02	KNO ₃	200
NaHCO ₃	50	CuCl ₂ , 2 H ₂ O	0,02	K ₂ HPO ₄	25
Na ₂ CO ₃	5	MnCl ₂ , 4 H ₂ O	0,4	Na ₂ SiO ₃ , 9 H ₂ O	71
MgSO ₄ , 2 H ₂ O	25	CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,01		
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	25	H ₃ BO ₃	0,001		
		Na ₂ HPO ₄	0,035		

Table 9 : Composition du milieu de culture Dauta modifié, sans EDTA et enrichi en silice (d'après Dauta 1982, modifié).

d'études de terrain (**Figure 55**). Cette diatomée, qui fait partie des espèces cosmopolites, est dotée d'une grande amplitude écologique et a été observée dans de nombreux habitats aquatiques (U.S. E.P.A. 2001). Elle est tout de même associée aux espèces reflétant la bonne qualité des milieux dans l'Indice Biologique Diatomées (Prygiel and Coste 2000), présentant une préférence marquée pour les milieux bien oxygénés. En ce qui concerne sa morphologie, elle est caractérisée par une taille relativement faible, inférieure à 15 μm , et appartient aux diatomées monoraphidées, possédant un raphé (fente longitudinale interrompant les stries du frustule) sur une seule valve (**Figure 70**). *A. minutissimum* fait partie des premières espèces colonisatrices des substrats, formant la couche algale basale des biofilms périphytiques. Cette espèce est en effet rattachée étroitement au support par l'intermédiaire d'un très court pédoncule, constitué de substances polysaccharidiques excrétées apicalement à travers le raphé (Roemer *et al.* 1984, Hoagland *et al.* 1993).

A-1. DESCRIPTION DES SYSTEMES EXPERIMENTAUX ET CONTROLE DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES

De petites unités expérimentales (UE_s) ont été conçues afin de permettre l'étude du développement d'*A. minutissimum* dans des conditions contrôlées (nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats, vitesse du courant, conditions lumineuses, température, ressources en nutriments, conditions de contamination par le Cd), fixées de manière à recréer des conditions proches de celles observées lors des études de communautés menées sur le terrain et en laboratoire¹.

A-1.1. DESCRIPTION DE L'UNITE EXPERIMENTALE (UE)

L'UE est un aquarium en verre collé de 3 litres (12 x 12 x 30 cm), dont les parois internes ont été revêtues de plastique (poche Plastiluz, norme alimentaire), de manière à limiter la fixation du Cd sur les parois et à éviter la contamination des unités. Chaque UE a été divisée en deux compartiments (**Figure 71**):

- en haut de l'aquarium, un portoir en PVC a été suspendu aux rebords de l'unité, contenant 6 lames de verre type "lames de microscope" (7,6 x 2,6 cm) servant de

¹ cf. Parties III, IV et V.

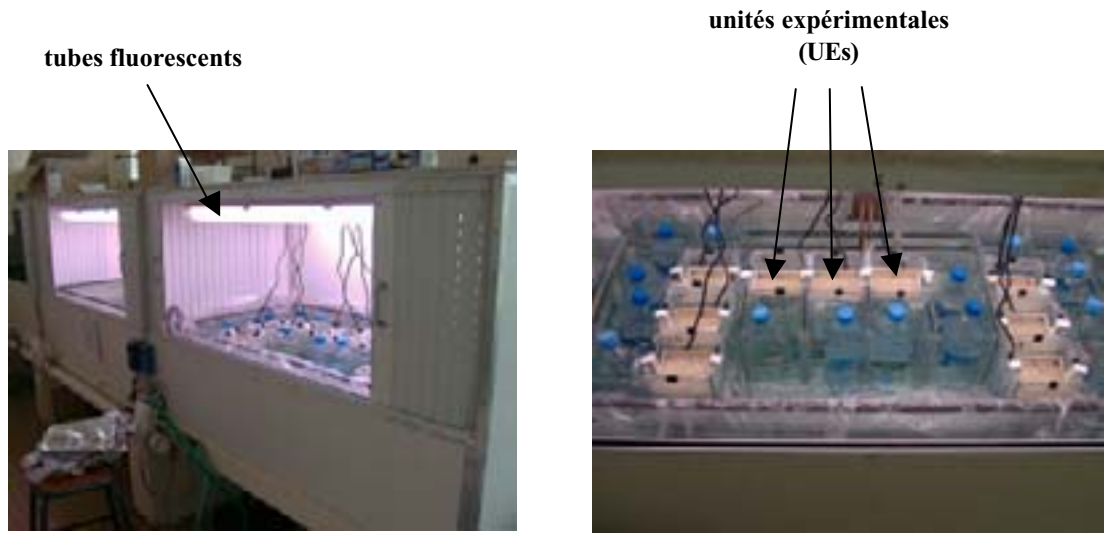


Figure 72 : Photographies du bain-marie (140 x 65 x 30 cm) dans lequel ont été placées les UEs, permettant la régulation de la température et de l'éclairage durant l'expérience.

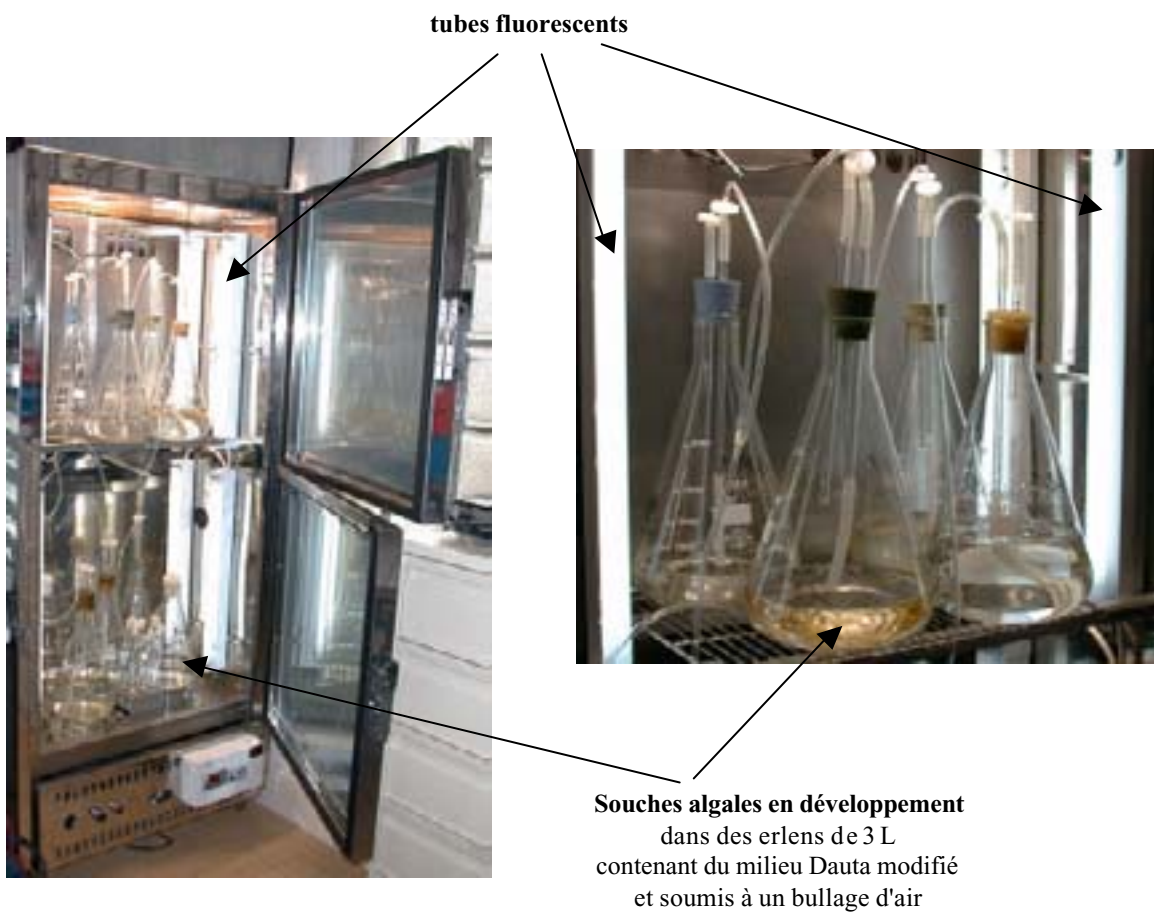


Figure 73 : Photographies de l'armoire thermostatée dans laquelle ont été réalisées les cultures monospécifiques de diatomées, permettant la régulation de la température et de l'éclairage .

substrats artificiels pour les algues périphytiques, disposées parallèlement les unes aux autres dans le sens du courant ;

- au fond de l'aquarium, une pompe immergée dans une réserve de milieu de culture a assuré la circulation en continu de ce milieu entre le fond de l'UE et la partie surélevée, à un débit moyen de $1,4 \text{ L.s}^{-1}$, correspondant à une vitesse du courant voisine de 20 cm.s^{-1} au niveau des substrats artificiels. Un tube en PVC perforé disposé sur toute la largeur de l'unité a permis d'homogénéiser l'écoulement du milieu circulant au niveau de toutes les lames de verre.

Au début de l'expérience, le **milieu circulant** a été constitué à partir du mélange suivant :

- 500 mL de milieu Dauta modifié, enrichi en silice (nutriment essentiel à la croissance des diatomées) et dépourvu d'EDTA, afin de s'affranchir de ses très fortes capacités de complexation à l'égard des métaux (Stauber and Florence 1989) (**Table 9**) ;

- 500 mL d'une suspension de l'espèce *A. minutissimum* issue d'une culture axénique âgée de dix jours, réalisée au laboratoire dans du milieu Dauta modifié, et qui présentait une densité d'environ $700\,000 \text{ cellules.mL}^{-1}$ et des concentrations en sels nutritifs très faibles au moment de l'introduction dans les UEs (concentrations en NO_3^- , PO_4^{2-} et SiO_2 inférieures aux limites de détection des techniques de dosage utilisées[♦]).

Le milieu circulant des unités expérimentales présentait donc au début de l'expérience des concentrations en nutriments diluées par rapport à la composition du milieu Dauta (facteur 2).

A-1.2. REGULATION DES FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES

Les UEs ont été placées dans un **bain-marie** de 270 L (140 x 65 x 30 cm) (**Figure 72**), équipé d'un système de régulation de la température de l'eau commandé par une thermosonde (association d'un système de chauffage et de refroidissement). La température a ainsi été fixée à $15 \pm 0,5$ °C. L'homogénéité de ce facteur a été assurée par le brassage permanent de l'eau à l'aide d'une pompe immergée dans le bain-marie.

[♦] Partie II.

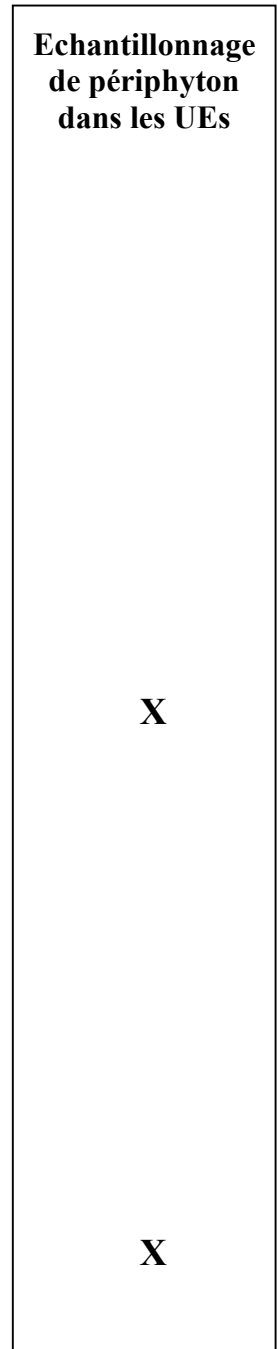
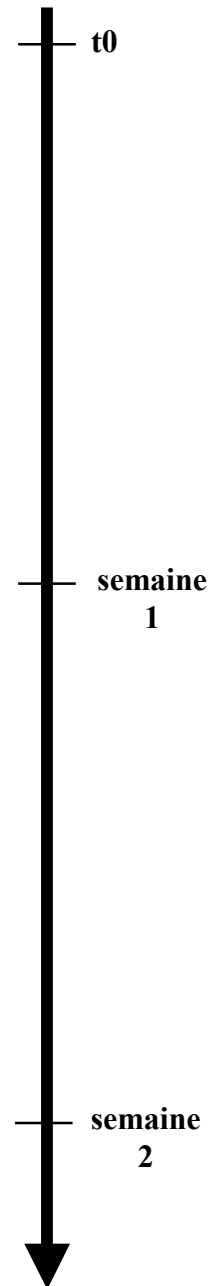
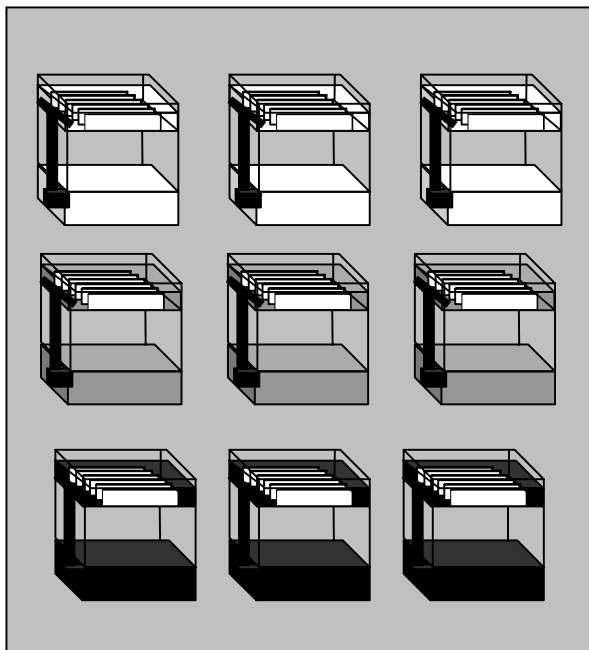
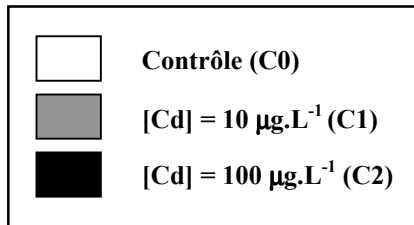


Figure 74 : Protocole de l'expérience monospécifique menée dans des unités expérimentales (UEs) de laboratoire.

L'éclairage a été artificiellement produit par deux tubes fluorescents (Sylvania F 36W/GRO), situés à 45 cm au-dessus des unités et produisant une intensité lumineuse moyenne de $39,7 \mu\text{mol.s}^{-1}\text{m}^{-2}$ à la surface des UEs (concernant les radiations actives pour la photosynthèse, 400 - 700 nm). La photopériode a été fixée à 10 h d'éclairage et 14 h d'obscurité (10L / 14D), grâce à des horloges programmables.

Trois niveaux de contamination de la colonne d'eau par le Cd ont été retenus: le niveau contrôle (C0 : pas d'ajout de Cd) ; le niveau $10 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ (C1), correspondant à la concentration moyenne en Cd mesurée sur la station "polluée" lors de nos études de terrain le long du gradient de pollution de la rivière Lot¹ ; et le niveau $100 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ (C2), correspondant à une concentration nettement supérieure, mais fréquemment observée au niveau de rivières plus fortement polluées (Ivorra *et al.* 1999, Rushforth *et al.* 1981). Ces trois niveaux de contamination correspondent aux niveaux retenus lors des expériences menées en laboratoire, sur des communautés de diatomées importées de la rivière Lot².

Afin d'assurer des conditions d'exposition au Cd stables au sein de nos unités expérimentales, les niveaux de contamination ont été rigoureusement contrôlés pendant toute la durée de notre expérience. En effet, à partir d'un ajout initial de CdCl_2 dans la colonne d'eau des UEs, permettant l'obtention de la concentration nominale recherchée, de nombreux facteurs contribuent à faire décroître la concentration en Cd dans l'eau (adsorption sur les parois du système, bioaccumulation par les algues, etc.). Pour compenser ces phénomènes de décroissance, la méthode des ajouts cycliques a été choisie: des ajouts de CdCl_2 ont été effectués quotidiennement, à partir d'une solution aqueuse concentrée (CdCl_2 Merk - 10 mg.L^{-1}). Afin de définir les volumes des ajouts nécessaires, la concentration en cadmium dans la colonne d'eau a été dosée très régulièrement dans chaque système expérimental, selon la méthodologie décrite précédemment³.

A-2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une culture axénique d'*A. minutissimum* (souche L1486, Freshwater Diatom Culture Collection, Loras College, Dubuque, IOWA, U.S.A) a été mise en route au laboratoire dix jours avant le début de l'expérience de contamination. Cette culture a été réalisée dans des erlens de 3 L contenant du milieu Dauta modifié (**Table 9**), placés dans une armoire thermostatée maintenant une

¹ cf. Parties III et IV.

² cf. Partie V.

³ cf. Partie II-C.1.

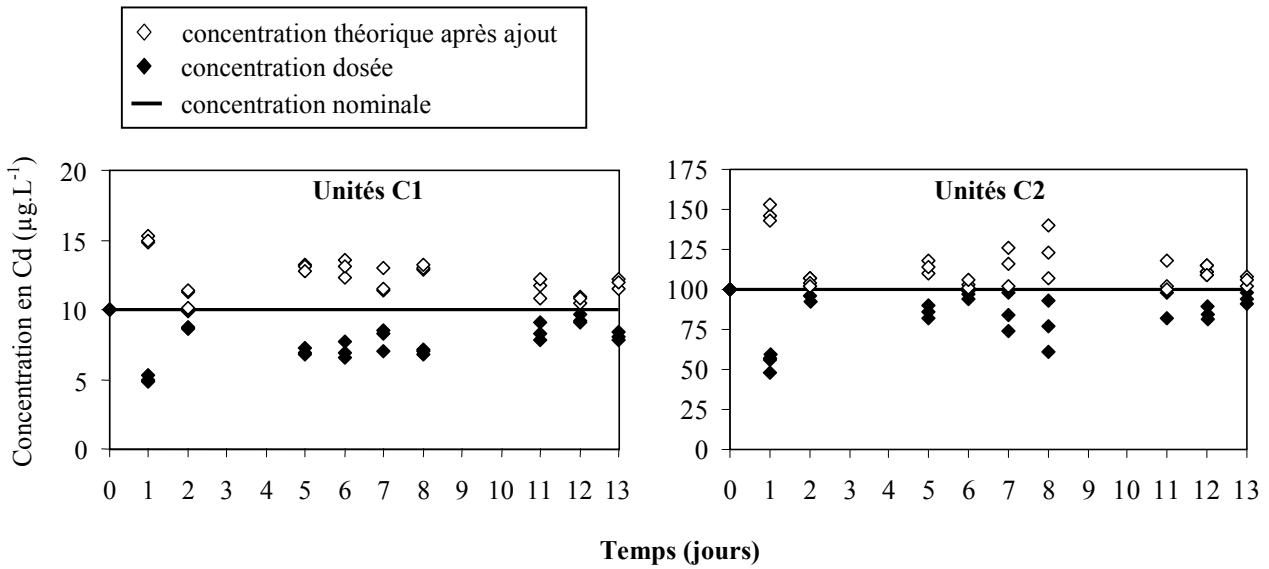


Figure 75 : Evolution des concentrations en Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans la colonne d'eau des unités expérimentales contaminées (C1 et C2).

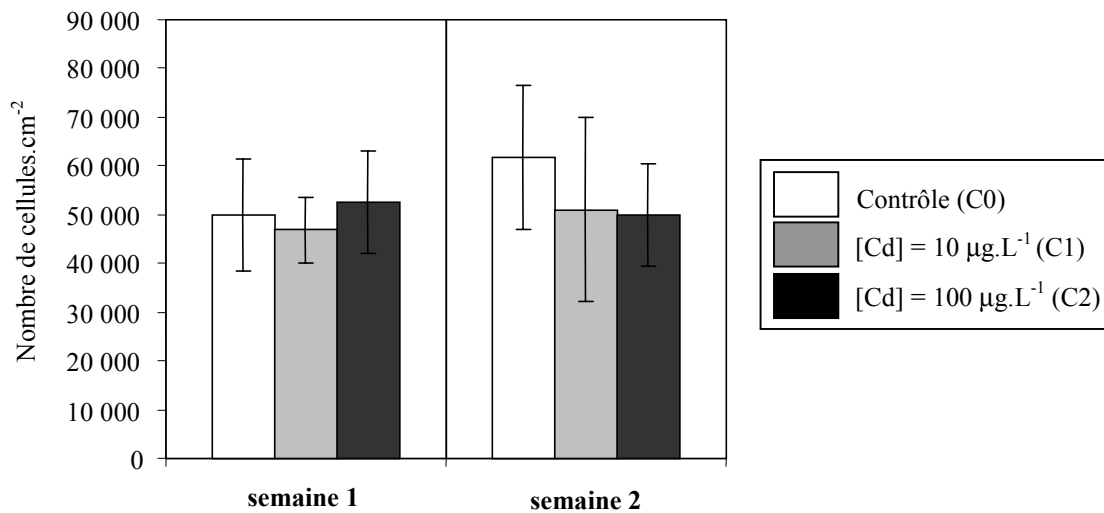


Figure 76 : Densités cellulaires d'*Achnanthydium minutissimum* sur les substrats artificiels (nombre de cellules.cm⁻²) (valeur moyenne et écart-type, n=3) dans les unités expérimentales Co, C1 et C2, après 1 et 2 semaines de colonisation.

température de 20°C et un éclairage moyen de 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (photopériode 14 L / 10 D) (**Figure 73**). Un bullage continu d'air a été mis en place dans les erlens, afin de limiter l'augmentation de pH résultant de l'activité photosynthétique des algues (production de CO_2).

Au bout de dix jours, l'expérience de contamination a commencé, immédiatement après l'introduction de la suspension d'*A. minutissimum* et de milieu Dauta modifié dans les unités. Neuf UEs ont été mises en place (trois répétitions par niveau de contamination) (**Figure 74**), et la densité algale a été analysée sur les substrats artificiels après 1 et 2 semaines de colonisation, à partir du prélèvement de trois lames de verre dans chaque unité, regroupées pour former un seul échantillon, et immédiatement remplacées par des lames vierges pour maintenir des conditions hydrodynamiques identiques dans les UEs.

B- RESULTATS ET DISCUSSION

B-1. CONDITIONS DE CONTAMINATION

Les concentrations en Cd mesurées dans la colonne d'eau des UEs contaminées (C1 et C2) sont présentées sur la **Figure 75**, avec les concentrations théoriques obtenues après les ajouts de Cd. La pression de contamination moyenne, établie à partir de l'ensemble des valeurs mesurées et des valeurs théoriques après ajouts, était proche de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans les UEs C1 et de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans les UEs C2. Pour chaque niveau de contamination, les valeurs mesurées dans les trois UEs "répétitions" ont présenté de faibles variations.

La procédure de contamination utilisée, suivant la méthode des ajouts cycliques de contaminant, n'a pas conduit au maintien d'une concentration constante et identique à la concentration nominale recherchée tout au long de l'expérience. Elle a toutefois permis de contrôler les fluctuations des pressions de contamination, facilitant ainsi l'analyse comparative entre les deux conditions d'exposition étudiées, au cours des deux semaines d'expérimentation.

B-2. CROISSANCE D' *A. minutissimum*

La **Figure 76** présente l'évolution des densités cellulaires d'*A. minutissimum* sur les substrats artificiels, pour les trois niveaux de contamination (C0, C1 et C2). Des valeurs moyennes proches de 50 000 cellules.cm⁻² ont été observées dans toutes les UEs, après 1 et 2 semaines de colonisation. D'après les résultats des analyses de variance (ANOVA à deux facteurs), aucune différence significative de densité cellulaire n'apparaît entre les 3 niveaux de contamination, ni entre les deux temps de colonisation.

Ainsi, de fortes concentrations en Cd (100 µg.L⁻¹) n'affectent pas significativement la croissance d'*A. minutissimum* dans nos conditions expérimentales. Pourtant, des effets toxiques du cadmium sur la reproduction ont été mis en évidence chez plusieurs espèces de diatomées, pour des concentrations nettement inférieures. D'après les travaux de Guanzon *et al.* (1994), une concentration de 2,13 µg Cd.L⁻¹ réduirait de 50 % la croissance de la diatomée *Aulacoseira granulata*. Une exposition de 20 à 30 heures à une concentration de Cd supérieure à 10 µg.L⁻¹ arrêterait totalement la croissance d'*Asterionella formosa* (Conway 1978). D'après Berland *et al.* (1977) et Il'Yash *et al.* (1997), la division cellulaire de *Skeletonema costatum* diminuerait significativement avec l'augmentation de la concentration en Cd dans le milieu, pour des niveaux compris entre 10 et 100 µg.L⁻¹. Rappelons toutefois que ces expériences monospécifiques ont été réalisées sur des cellules algales cultivées en suspension, alors que notre étude a été menée au niveau de cellules organisées en biofilms périphytiques. Des effets toxiques nettement moins prononcés peuvent donc être attendus dans les conditions de notre expérience, la matrice organique constituée des sécrétions polysaccharidiques des bactéries et des algues modifiant les interactions physico-chimiques entre le milieu aquatique environnant et le périphyton, et pouvant notamment réduire la biodisponibilité et la toxicité de ces métaux vis-à-vis des organismes situés à l'intérieur du biofilm (Lock *et al.* 1984, Ivorra *et al.* 2000 a).

Takamura *et al.* (1989) avaient établi qu'une décroissance de 50 % de l'activité photosynthétique d'*A. minutissimum* n'était atteinte que pour des concentrations en Cd nettement supérieures à celles que nous avons étudiées, allant de 3 000 µg.L⁻¹ dans le cas de souches provenant de milieux non pollués, jusqu'à 35 000 µg.L⁻¹ dans le cas de souches provenant de milieux pollués par les métaux, qui avaient pu développer des mécanismes d'adaptation à long-terme.

La tolérance au Cd d'*A. minutissimum* observée au cours de notre expérience permet de supposer que cette espèce présente "naturellement" des mécanismes de protection vis-à-vis

des métaux ou possède la capacité d'en développer rapidement. Parmi ces mécanismes peuvent être évoqués la diminution du nombre de sites de fixation des métaux à la surface cellulaire, l'inhibition de l'absorption des métaux, le développement de mécanismes d'exclusion ou de détoxification interne et l'augmentation du nombre de sites de stockage (Rai *et al.* 1981). L'induction de la production de phytochélatines en présence de métaux a été mise en évidence chez plusieurs espèces de diatomées (Ahner and Morel 1995, Ahner *et al.* 1995, Morelli and Scarano 1995, Morelli and Pratesi 1997, Torres *et al.* 1997, Morelli and Scarano 2001). Ces molécules sont des ligands cytosoliques ayant une forte affinité pour les métaux thioloprives, et en particulier pour le cadmium. Rappelons que Lee *et al.* (1996) ont mis en évidence l'apparition d'un export de complexes constitués de cadmium et de phytochélatines chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*, en présence de fortes concentrations en cadmium.

D'après les résultats des **études menées à l'échelle des communautés**, la tolérance aux métaux d'*A. minutissimum* est très controversée. Alors que certains auteurs ont observé une diminution de l'abondance relative de cette espèce au sein des communautés sur des sites pollués par les métaux (Besch *et al.* 1972, Lindström and Rorslett 1991, Austin *et al.* 1985, Sabater 2000), d'autres ont reporté des abondances d'*A. minutissimum* croissant avec les concentrations en métaux, et même des proliférations sur les sites contaminés (Say 1978, Leland and Carter 1984, Deniseger *et al.* 1986, Pérès 1996, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 1999). Les résultats des approches expérimentales que nous avons menées sur le terrain et en laboratoire ont globalement mis en évidence des comportements opposés d'*A. minutissimum* vis-à-vis de la pollution métallique. Cependant, les études de communautés ne permettent pas d'évaluer le niveau de tolérance "réel" aux métaux de populations de diatomées, l'abondance d'une espèce au sein de la communauté ne dépendant pas seulement de sa sensibilité au contaminant. Les interactions interspécifiques (compétition, etc.) jouent également un rôle, ainsi que les autres conditions environnementales, qui déterminent le développement de l'espèce indépendamment de son niveau de tolérance aux métaux. Rappelons que l'acclimatation des espèces à la pollution et leur capacité à développer des mécanismes de tolérance aux métaux peuvent également modifier leur résistance à la pollution métallique.

C- CONCLUSION

L'expérience de contamination réalisée sur une culture d'*A.minutissimum* a donc mis en évidence l'absence d'action inhibitrice du Cd sur la croissance cellulaire de cette diatomée périphytique, pour des concentrations allant jusqu'à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Les résultats de cette étude monospécifique, qui a permis de s'affranchir des interactions entre espèces existant au sein des communautés, ont donc confirmé les hypothèses de **tolérance aux métaux** émises pour cette espèce d'après les résultats de nos études à l'échelle des communautés, et formulées dans la littérature par de nombreux auteurs.

Le protocole expérimental mis en place, qui a permis de suivre la croissance des algues dans des conditions expérimentales offrant un plus grand degré de représentativité par rapport aux conditions naturelles que les bioessais traditionnels, semble bien adapté au développement des diatomées périphytiques et à l'étude de l'impact de différents facteurs sur ce développement. La réalisation d'expériences monospécifiques similaires avec des souches d'*A. minutissimum* provenant de sites naturels présentant différents niveaux de pollution métallique, prélevées par exemple sur la station "référence" de la rivière Lot et la station "polluée" du Riou-Mort, permettrait d'évaluer les **capacités d'adaptation à la pollution** de cette espèce.

Partie VII

BILAN ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

SOMMAIRE DE LA PARTIE VII

A- LES ETUDES EN LABORATOIRE CONSTITUENT DE BONS OUTILS METHODOLOGIQUES POUR AIDER A L'INTERPRETATION DES RESULTATS COMPLEXES OBTENUS <i>IN SITU</i>	151
A-1. BILAN METHODOLOGIQUE DE NOS TRAVAUX	151
A-2. DEVELOPPEMENTS ENVISAGES AU MOYEN DES SYSTEMES EXPERIMENTAUX DE LABORATOIRE	153
B- LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES PEUVENT REPRESENTER DES INDICATEURS BIOLOGIQUES PERTINENTS DE LA POLLUTION METALLIQUE	154
B-1. DANS LE CAS DE COMMUNAUTES EXPOSEES AU CADMIUM DES LA PHASE INITIALE DE LEUR DEVELOPPEMENT SUR DES SUBSTRATS ARTIFICIELS VIERGES, CE METAL ENTRAINE DES PERTURBATIONS NETTES DE L'ARCHITECTURE EN TROIS DIMENSIONS DES BIOFILMS	155
B-2. AU NIVEAU DES COMMUNAUTES MATURES, LA MATRICE ORGANIQUE DES BIOFILMS POURRAIT ATTENUER LES EFFETS DU CADMIUM ET RALENTIR LEUR REVELATION	156
B-3. PERSPECTIVES DE RECHERCHE VISANT A MIEUX APPREHENDER LES PROCESSUS COMPLEXES DE TOXICITE DES METAUX AU SEIN DES BIOFILMS PERIPHYTIQUES	157
C- LE DEVELOPPEMENT D'APPROCHES MONOSPECIFIQUES S'AVERE NECESSAIRE POUR EVALUER LES NIVEAUX DE TOLERANCE AUX METAUX DES DIATOMEES ET ETUDIER LEURS MECANISMES D'ADAPTATION	159

Cette dernière partie de notre mémoire vise à dresser un bilan général des résultats acquis au cours de nos recherches et, conjointement, de procéder à une analyse des supports méthodologiques utilisés et de leur adéquation par rapport à nos objectifs initiaux.

L'approche expérimentale originale que nous avons développée, associant des études menées en milieu naturel, le long d'un gradient de contamination polymétallique, et des études dans les conditions contrôlées du laboratoire, a permis d'aboutir à des conclusions très pertinentes concernant les effets de la pollution métallique sur la structure des communautés de diatomées périphytiques des écosystèmes lotiques. La confrontation des résultats de ces différentes études a apporté des réponses aux deux questions principales qui étaient à l'origine de nos travaux :

*D'une part, les études en laboratoire constituent de bons **outils méthodologiques** pour aider à l'interprétation des processus très complexes qui déterminent la structure des communautés de diatomées périphytiques en milieu naturel.*

*D'autre part, les communautés de diatomées périphytiques peuvent représenter des **indicateurs biologiques** pertinents de la pollution métallique.*

Le bilan des résultats issus de ces travaux est synthétisé dans les paragraphes suivants, ainsi que les principales perspectives de recherche qui en découlent.

A- LES ETUDES EN LABORATOIRE CONSTITUENT DE BONS OUTILS METHODOLOGIQUES POUR AIDER A L'INTERPRETATION DES RESULTATS COMPLEXES OBTENUS *IN SITU*

A-1. Bilan méthodologique de nos travaux

Dans les conditions complexes du **milieu naturel**, le choix de stations d'étude présentant des caractéristiques environnementales identiques, le long d'un gradient de pollution, se révèle quasiment impossible.

Ainsi, les trois stations retenues sur le "site-atelier" au niveau de la rivière Lot et du Riou-Mort (SO, France), ont été choisies de manière à présenter un gradient de pollution net par rapport aux concentrations en cadmium (Cd) et en zinc (Zn) dans la colonne d'eau. Durant nos expériences, d'autres différences significatives ont été mises en évidence entre ces stations (particulièrement entre la station "polluée" située sur le Riou-Mort et les stations "référence" et "faiblement polluée" du Lot), d'ordre hydrodynamique (vitesse du courant) et physico-chimique (température, concentrations en sels nutritifs). Des concentrations différentes en matières organiques biodégradables, traduisant le niveau de pollution organique, ont également été observées (données Agence de l'Eau Adour-Garonne 1998-99¹), et de nombreuses autres variations ont pu exister, pour lesquelles nous ne possédons pas d'informations, concernant par exemple les concentrations en polluants organiques (herbicides, fongicides, hydrocarbures, etc.) et en métaux autres que le Cd et le Zn (arsenic, cuivre, etc.).

Rappelons que lors des études menées en milieu naturel, l'évaluation rigoureuse de l'ensemble des facteurs abiotiques caractérisant les stations, ainsi que celle des facteurs de contamination, paraît très difficilement concevable. Dans ces conditions, l'inventaire exhaustif des facteurs régissant la structure des communautés de diatomées périphytiques le long d'un gradient de pollution s'avère impossible.

La complexité des mécanismes mis en jeu en milieu naturel, qui résulte de la très grande diversité des facteurs, agissant isolément et en interaction, et de leurs variations, quasi-permanentes dans l'espace et dans le temps, conduit à une difficulté, voire impossibilité dans certains cas, à dégager des relations causales bien définies. Toutefois, ces commentaires ne doivent pas minimiser **l'intérêt et l'importance des études de terrain**, qui représentent des

¹ cf. Partie II-A-2.2.

"référentiels" incontournables, reflétant les processus se déroulant à l'échelle des systèmes écologiques. Soulignons à nouveau que l'objectif premier de nos recherches, comme de toute étude environnementale, concerne l'analyse descriptive et interprétative de ces processus.

Face à cette dualité "complexité/représentativité", les **approches expérimentales menées en laboratoire**, qui permettent potentiellement de contrôler et de réguler tous les paramètres environnementaux, représentent le moyen de quantifier les effets d'un nombre limité de facteurs. Cependant, les résultats acquis dans les conditions simplifiées du laboratoire se heurtent aux difficultés d'extrapolation, et ils ne peuvent être utilisés qu'en étroite complémentarité avec les données provenant des études de terrain.

Notre démarche méthodologique a été fortement inspirée de ces notions de base, la complexité des communautés périphytiques en milieu naturel renforçant l'importance des approches expérimentales "réductionnistes"¹. Ainsi, suite aux études *in situ* menées le long du gradient de pollution polymétallique de la rivière Lot, nous avons développé des études en laboratoire, à l'échelle des communautés de diatomées, afin d'étudier les effets de la contamination par un seul métal, le cadmium (Cd).

Au cours de ces études en laboratoire, les facteurs abiotiques (nature des substrats de colonisation, profondeur d'immersion de ces substrats, vitesse du courant, conditions lumineuses, température, ressources en nutriments, niveau de contamination par le Cd) ont été rigoureusement contrôlés, pour s'affranchir des variations naturelles observées sur le terrain. Les conditions biotiques ont également été simplifiées. Les systèmes contenant un milieu de culture synthétique dilué, les quantités de matières organiques biodégradables et de matières en suspension (MES, > 0,45 µm) étaient négligeables, et ont limité le développement des communautés bactériennes, qui interfèrent de manière complexe avec les microalgues périphytiques en milieu naturel.

Bien que ces conditions expérimentales puissent apparaître comme très artificielles ou "réductionnistes"¹ par rapport aux conditions naturelles, les communautés de diatomées périphytiques qui se sont développées dans les systèmes expérimentaux de laboratoire ont présenté des caractéristiques globalement comparables à celles observées dans les canaux de terrain, disposés sur la berge des cours d'eau lors de notre première série d'études *in situ*².

¹ "réductionnisme" est pris au sens de simplification des conditions au regard de la physico-chimie des milieux, des facteurs biotiques et des modalités de la contamination. Cette simplification résulte de la réduction du nombre des paramètres par rapport au contexte naturel, et/ou du contrôle et de la régulation de certains d'entre eux.

² cf. Partie III-B.

Les systèmes expérimentaux que nous avons conçus en laboratoire présentent donc un bon niveau de représentativité par rapport aux processus se déroulant en milieu naturel. Ils s'avèrent être de bons outils méthodologiques pour aider à l'interprétation des résultats complexes obtenus sur le terrain, concernant notamment les impacts des polluants métalliques sur la composante diatomique du périphyton. Ils nous ont ainsi permis d'accorder au cadmium un rôle prépondérant vis-à-vis des perturbations de la structure des communautés naturelles observées sur la station "polluée" du "site-atelier".

A-2. Développements envisagés au moyen des systèmes expérimentaux de laboratoire

Les travaux que nous avons menés en laboratoire ont été ciblés sur l'analyse des caractéristiques structurales des communautés de diatomées, en relation avec leur intérêt potentiel pour la bioindication. Les supports méthodologiques développés pourraient également représenter de bons modèles expérimentaux pour appréhender les **atteintes fonctionnelles**, comme par exemple les effets des métaux sur l'activité photosynthétique des diatomées, ou évaluer les **capacités d'accumulation des métaux** par ces communautés.

Les approches de ce type, réalisées habituellement au niveau de biofilms naturels constitués de nombreuses composantes biotiques (bactéries, microalgues, champignons, etc.) et abiotiques (particules organiques et inorganiques), ne permettent pas d'estimer les réponses attribuables aux seules communautés de diatomées. En revanche, dans les conditions expérimentales du laboratoire, ceci paraît plus facilement envisageable. La réalisation des études en conditions automnales, comme ce fut le cas durant nos travaux, permet en effet de collecter des communautés périphytiques naturelles composées majoritairement de diatomées, avec de très faibles proportions d'algues vertes et de Cyanophycées. L'introduction de ces communautés dans nos systèmes expérimentaux, contenant un milieu de culture synthétique dilué, avec des quantités négligeables de matières organiques et de matières en suspension, permet de constituer des biofilms de diatomées contenant peu de bactéries et de particules organiques et inorganiques.

Nos travaux ont été limités à l'étude des effets d'un seul métal, le Cd, sur une composante précise du périphyton, les communautés de diatomées. La confrontation des résultats obtenus avec ceux issus des études de terrain ayant validé cette approche

méthodologique, celle-ci pourrait être désormais complétée par des **approches plus complexes**. Rappelons que la simplification ou la complexification progressive des conditions expérimentales représente le moyen d'améliorer notre analyse interprétative des processus complexes mis en jeu.

Des expériences prenant en compte d'une part la contamination par le zinc (Zn), et d'autre part la contamination mixte par le Cd et le Zn, peuvent être envisagées. Elles permettraient d'interpréter plus finement les résultats de terrain, le gradient de contamination polymétallique de la rivière Lot étant lié à des rejets combinés de Cd et de Zn. L'étude de la contamination mixte par ces deux métaux se révélerait particulièrement intéressante d'un point de vue écotoxicologique, pour appréhender les effets de synergie ou d'antagonisme entre un élément essentiel, comme le Zn, et un métal toxique, comme le Cd.

La complexification des facteurs biotiques est également envisageable. L'étude des interactions entre les communautés de diatomées et les communautés bactériennes, notamment, offre de larges perspectives de recherche. La plupart des travaux menés jusqu'à présent sur le périphyton se sont exclusivement intéressés aux microalgues de ce compartiment, et à leur capacités photosynthétiques. Cependant, les organismes hétérotrophes jouent également un rôle important au sein des biofilms périphytiques. Les bactéries, en particulier, sont présentes en grandes quantités en milieu naturel, et peuvent interférer de manière complexe avec les microalgues au niveau des processus contrôlant la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux. Un enrichissement du milieu de culture en substances organiques, dans nos systèmes expérimentaux de laboratoire, favoriserait le développement d'une composante bactérienne et permettrait, par comparaison entre les différentes conditions expérimentales, de préciser les rôles respectifs des deux types de communautés (diatomées et bactéries).

B- LES COMMUNAUTES DE DIATOMEES PERIPHYTIQUES PEUVENT REPRESENTER DES INDICATEURS BIOLOGIQUES PERTINENTS DE LA POLLUTION METALLIQUE

Les approches expérimentales complémentaires que nous avons menées en milieu naturel, le long d'un gradient de contamination polymétallique, et en laboratoire, pour évaluer les effets de la contamination par le Cd sur des communautés ramenées du terrain, révèlent les

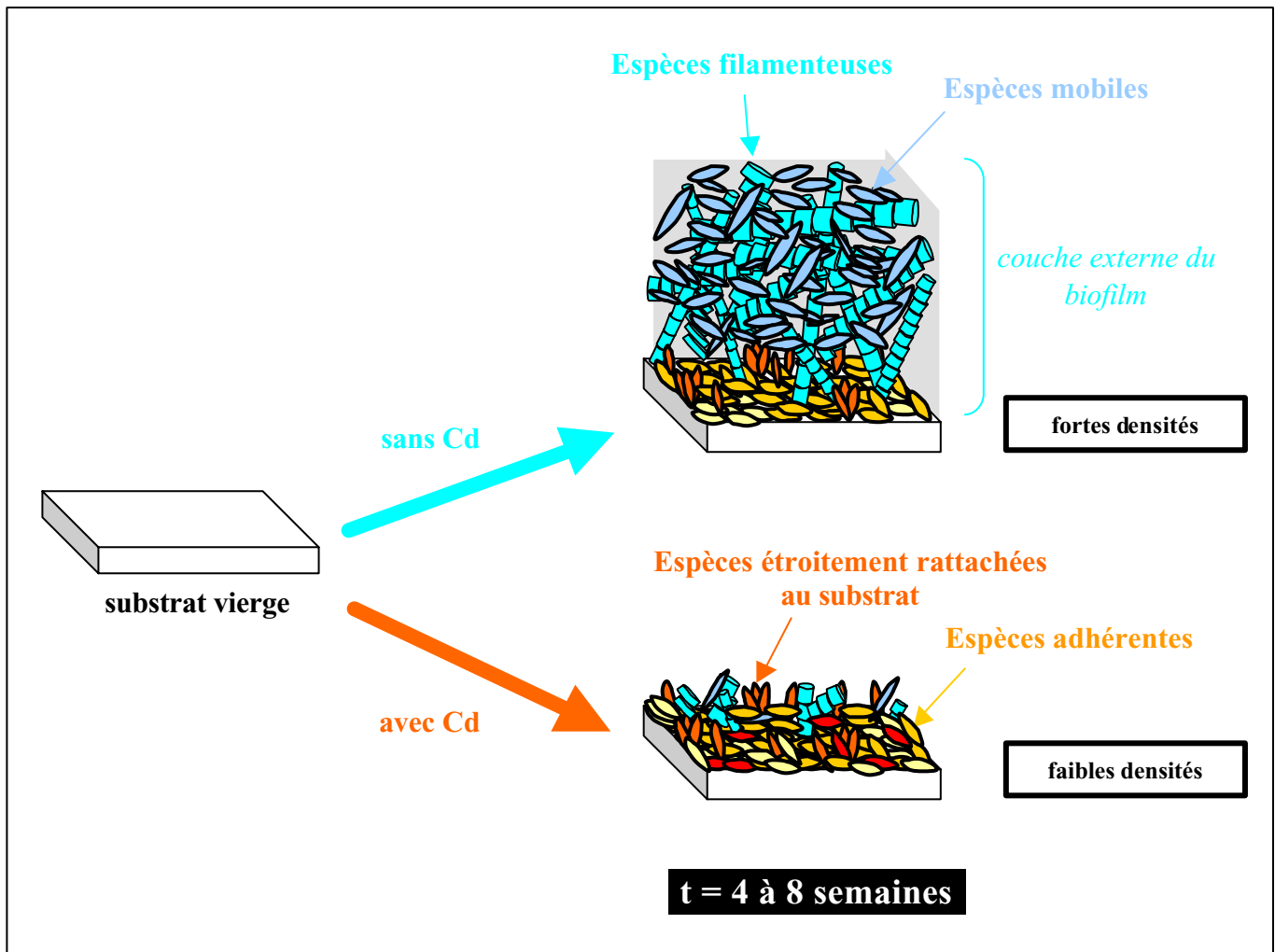


Figure 77 : Représentation schématique des effets de la contamination par le cadmium (Cd) sur l'architecture des communautés de diatomées se développant sur les substrats artificiels vierges, à court-terme (après quatre à 8 semaines de colonisation).

potentialités d'utiliser les communautés de diatomées périphytiques en tant que **bioindicateurs de la pollution métallique**. La confrontation des résultats de ces études met en évidence des effets marqués du Cd sur la structure des communautés périphytiques, visibles dans les conditions contrôlées du laboratoire et dans les conditions complexes du milieu naturel, même pour des niveaux de contamination relativement faibles ($10 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$), souvent rencontrés en milieu naturel.

B-1. Dans le cas de communautés exposées au Cd dès la phase initiale de leur développement sur des substrats artificiels vierges, ce métal entraîne des perturbations nettes de l'architecture en trois dimensions des biofilms

Nos résultats montrent qu'à **court-terme** (après quatre à huit semaines de colonisation), le Cd retarde, voire inhibe dans le cas de niveaux d'exposition importants ($100 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$), la croissance globale des communautés, et exerce donc des effets négatifs sur la **densité** totale des diatomées. Il entraîne également des modifications marquées de la **composition spécifique** des communautés. Comme le montre la **Figure 77**, dans laquelle nous avons schématisé les principales conclusions de nos études de terrain et de laboratoire, la pollution métallique, et plus précisément le Cd, inhibe préférentiellement le développement des diatomées constitutives des couches externes du biofilm, au profit des espèces adhérentes et étroitement rattachées au support. L'épaisseur des biofilms est ainsi fortement réduite sur les substrats.

Ces perturbations de la structure des communautés liées au Cd n'ont eu des répercussions négatives sur **la richesse et la diversité spécifiques** que pour le plus fort niveau de contamination étudié en laboratoire ($100 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$). Ceci explique pourquoi les décroissances de ces deux indices, rapportées par de nombreux auteurs sur des sites naturels contaminés par de fortes concentrations en métaux (Say 1978, Say and Whitton 1980, Lampkin and Sommerfeld 1982, Roch *et al.* 1985, Denieseger *et al.* 1986, Crossey and La Point 1988, Sabater 2000), n'ont pas été retrouvées au niveau de notre station "polluée" sur le Riou-Mort, qui a présenté des concentrations en Cd et en Zn comparativement plus faibles ($< 15 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$ et $700 \mu\text{g Zn.L}^{-1}$).

Nos résultats montrent également que dans les conditions complexes du milieu naturel, les effets des métaux sur l'architecture des communautés peuvent être atténués par les **effets concomitants des autres facteurs environnementaux**. En effet, des perturbations nettement

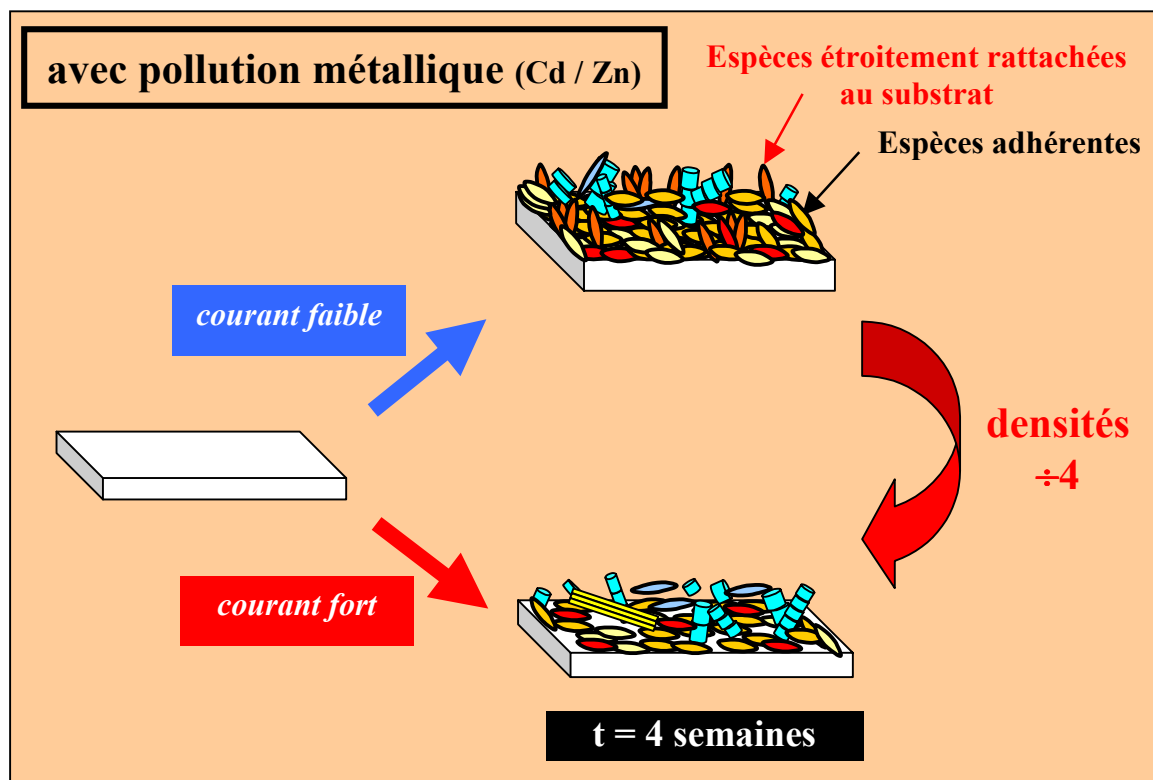
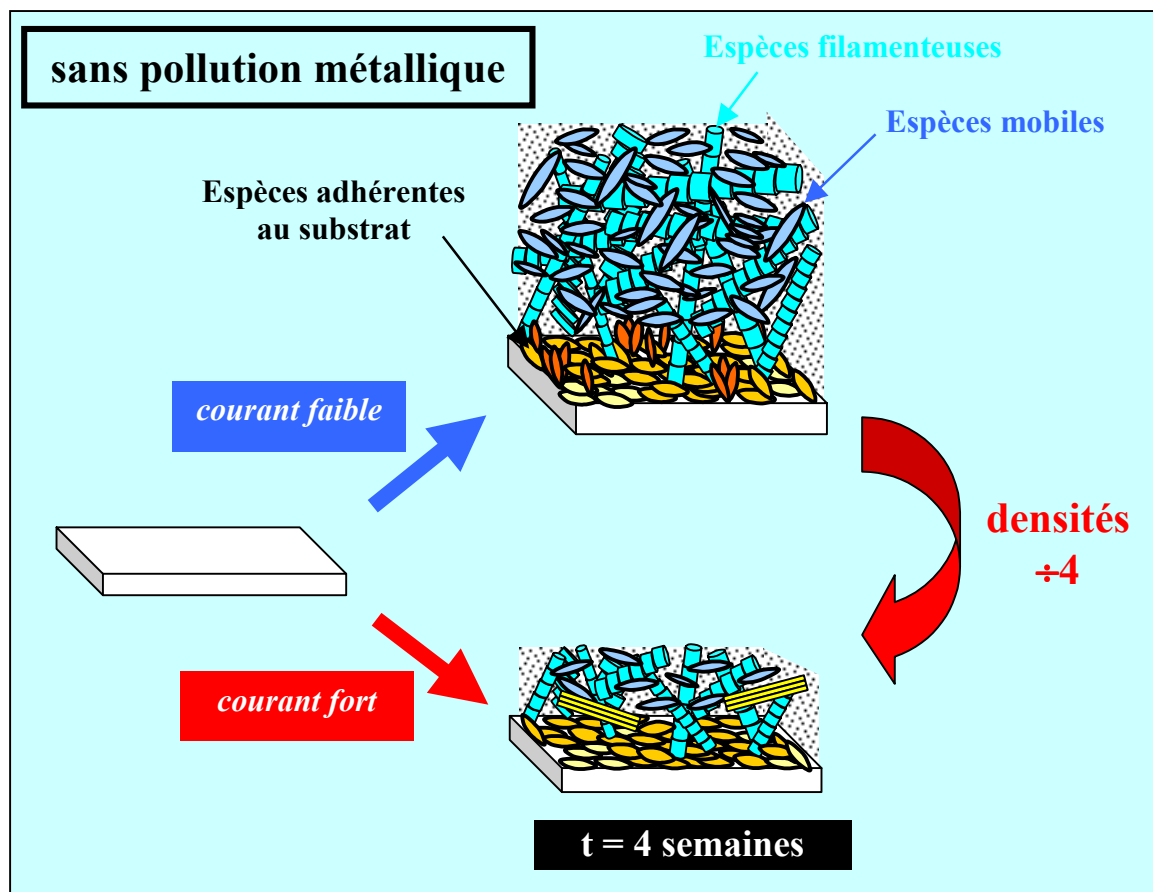


Figure 78 : Représentation schématique des effets du courant sur l'architecture des communautés de diatomées se développant sur les substrats artificiels vierges, à court-terme (après quatre à huit semaines de colonisation) :

- au niveau de la station "réfrence" du Lot, qui ne présente pas de pollution métallique,
- au niveau de la station "polluée" par le cadmium (Cd) et le zinc (Zn), sur le Riou-Mort.

Les résultats obtenus en condition de "**courant faible**" correspondent aux études *in situ* en canaux expérimentaux, et les résultats "**courant fort**" aux études *in situ* menées avec des substrats immergés directement dans les cours d'eau.

moins importantes ont été observées lors de notre deuxième série d'études *in situ*¹, menée dans les conditions naturelles de chaque site, au cours de laquelle les **effets érosifs du courant** ont ralenti le développement global des communautés sur l'ensemble des stations d'étude, à court-terme (après huit semaines de colonisation). Cependant, comme le montre schématiquement la **Figure 78**, même si l'augmentation du courant conduit à la formation de biofilms plus fins sur les substrats (densités $\div 4$ avec et sans pollution métallique), les effets attribuables à la pollution métallique, et principalement au Cd, au niveau de la composition spécifique des communautés sont toujours observés. Une réduction du développement des diatomées constitutives des couches externes du biofilm reste en effet visible sur la station "polluée", au profit des espèces adhérentes et étroitement rattachées au support.

Notons que l'étude de **communautés périphytiques naturelles**², collectées sur des substrats du lit des cours d'eau (galets, cailloux) le long du gradient de pollution métallique, a mis en évidence la persistance à **long-terme** des perturbations structurales attribuables aux métaux et, plus précisément, au Cd. En revanche, les conséquences des effets érosifs du courant n'étaient plus visibles au niveau de ces communautés, développées durant de longues périodes de temps (jusqu'à plusieurs mois, depuis la dernière crue).

B-2. Au niveau des communautés mûres, la matrice organique des biofilms pourrait atténuer les effets du Cd et ralentir leur révélation

Des perturbations nettement plus progressives de la structure des communautés de diatomées périphytiques ont été mises en évidence dans le cas de communautés exposées au métal à un stade avancé de développement (maturité).

Comme l'ont évoqué plusieurs auteurs (Lock *et al.* 1984, Medley and Clements 1998, Ivorra *et al.* 2000 a), ceci pourrait être lié à un **rôle protecteur exercé par la matrice organique** qui recouvre les substrats, et qui possède de nombreux sites de fixation des métaux (Rose and Cushing 1970, Lock *et al.* 1984, Freeman and Lock 1995, Gray *et al.* 2001). Cette matrice pourrait ainsi réduire la biodisponibilité et la toxicité du Cd à l'égard des organismes périphytiques. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer les sensibilités variables au Cd des différentes "formes de

¹ cf. Partie IV-B.

² cf. Partie III-C.

croissance"¹ des diatomées, que nous avons mises en évidence lors des études des stades initiaux de développement sur des substrats vierges. En effet, les espèces filamenteuses et les espèces mobiles, constitutives des couches externes des biofilms et qui semblent présenter une grande sensibilité à la pollution métallique, sont en contact direct avec la colonne d'eau et ses contaminants éventuels. En revanche, les espèces étroitement rattachées au support, qui ont présenté une meilleure tolérance au Cd, se trouvent imbriquées dans un tapis constitué des sécrétions polysaccharidiques provenant des bactéries et des algues, qui modifient les interactions physico-chimiques entre le milieu aquatique environnant et le périphyton, et protège ces cellules basales des contaminants extérieurs.

Rappelons qu'en plus de ce rôle protecteur vis-à-vis des métaux, la matrice organique des communautés mûres pourrait également exercer un effet de "**piégeage**", qui conduirait à **sous-estimer les effets réels du Cd** sur la structure des communautés. En effet, les cellules affectées par le métal (mortes ou en "mauvais état") peuvent être piégées au sein de la matrice, et être prises en compte, au même titre que les diatomées vivantes, pour l'évaluation de la structure des communautés².

D'après nos résultats, les communautés de diatomées périphytiques pourraient représenter des indicateurs biologiques pertinents de la pollution métallique. Cependant, les effets d'une contamination soudaine sur des communautés déjà développées semblent plus difficiles à diagnostiquer, l'analyse du développement des communautés sur des substrats artificiels vierges paraît préférable à l'échantillonnage de communautés naturelles.

B-3. Perspectives de recherche visant à mieux appréhender les processus complexes de toxicité des métaux au sein des biofilms périphytiques

Le protocole d'évaluation de la structure des communautés que nous avons utilisé, basé sur l'identification microscopique des diatomées, après nettoyage par traitement chimique des frustules, semble bien adapté à l'étude du développement des communautés sur des substrats artificiels vierges, si l'on considère que seules les cellules en "bon état" peuvent coloniser activement les substrats et se reproduire. En revanche, ce protocole présente des

¹ cf. Partie I-A.2.1.

² Notons que la **distinction entre diatomées vivantes et mortes** est un problème récurrent, inhérent à la méthodologie d'identification de ces algues, qui repose sur l'examen microscopique des frustules débarrassés de leur contenu organique.

limites pour l'étude des communautés déjà développées au moment de l'exposition au contaminant. Nos résultats montrent que les perturbations structurales attribuables au Cd apparaissent très progressivement au niveau de ces biofilms mûres. Ils n'ont cependant pas permis de déterminer si cela était lié à une atténuation réelle de la toxicité du métal vis-à-vis des diatomées, due au rôle protecteur de la matrice organique, ou si l'effet de "piégeage" des cellules mortes exercé par cette matrice conduisait à sous-estimer les perturbations structurales.

L'estimation du taux de **mortalité des différentes espèces de diatomées** au sein des communautés, après leur exposition au Cd, serait un moyen d'évaluer les effets réels du métal. La distinction entre les diatomées vivantes et mortes peut se faire en recherchant la présence de chloroplastes au sein des cellules, en microscopie photonique, sur du matériel vivant ou conservé dans du formol. L'utilisation de colorants vitaux est également envisageable. Cependant, de tels protocoles rendent difficile l'acquisition d'informations au niveau spécifique, l'identification précise des diatomées n'étant possible qu'après dégradation du contenu cellulaire des frustules. L'utilisation des outils de la biologie moléculaire pour évaluer l'état de la communauté, ainsi que sa richesse et sa diversité spécifiques, pourraient être des alternatives intéressantes (au moyen par exemple de sondes d'acides nucléiques permettant d'identifier les espèces présentes), mais peu de protocoles semblent avoir été mis au point jusqu'à présent sur les microalgues.

En revanche, le développement de méthodologies permettant d'**analyser la pénétration et la distribution des métaux au sein des communautés périphytiques**, et ainsi d'évaluer les qualités protectrices de la matrice organique, semble tout à fait envisageable. La technique d'autométallographie représenterait un des moyens pour caractériser les sites de répartition des métaux dans les différentes couches des biofilms. Cette technique de révélation histochimique a déjà été développée au LEESA pour localiser visuellement les métaux à l'échelle tissulaire ou cellulaire, au niveau de plusieurs organismes (crabes, poissons, etc.).

Notons que le développement de **méthodes photographiques d'analyses structurales** des communautés périphytiques est actuellement en cours au LEESA, au moyen d'outils d'imagerie permettant de visualiser l'architecture en trois dimensions des communautés (microscopie photonique et électronique à balayage et à transmission, sur des coupes

Espèces "sensibles" au Cd	Espèces "tolérantes" au Cd	Espèces à comportement variable
MVAR <i>Melosira varians</i> NRCH <i>Navicula reichardtiana</i> NDIS <i>Nitzschia dissipata</i> NFBU <i>Nitzschia frustulum</i> <i>var. bulnheimiana</i>	ACUR <i>Achnanthes curtissima</i> ALFR <i>Achnanthes lanceolata</i> <i>ssp. frequentissima</i> APED <i>Amphora pediculus</i> CDUB <i>Cyclostephanos dubius</i> CPLA <i>Cocconeis placentula</i> CPLI <i>C. placentula var. lineata</i> CSTE <i>Cyclotella stelligera</i> DVUL <i>Diatoma vulgare</i> ENMI <i>Encyonema minutum</i> FCAP <i>Fragilaria capucina</i> FCRO <i>Fragilaria crotonensis</i> FULN <i>Fragilaria ulna</i> GPAR <i>Gomphonema parvulum</i> NMIN <i>Navicula minima</i> NMLF <i>Navicula molestiformis</i> NLIN <i>Nitzschia linearis</i> NPAL <i>Nitzschia palea</i> PMIC <i>Pinnularia microstauron</i> PGLO <i>Pinnularia globiceps</i> RABB <i>Rhoicosphenia abbreviata</i> SANG <i>Surirella angusta</i>	AMIN <i>Ach. minutissimum</i> FCAP <i>Fragilaria capucina</i> NCPR <i>Navicula capitatoradiata</i>

a

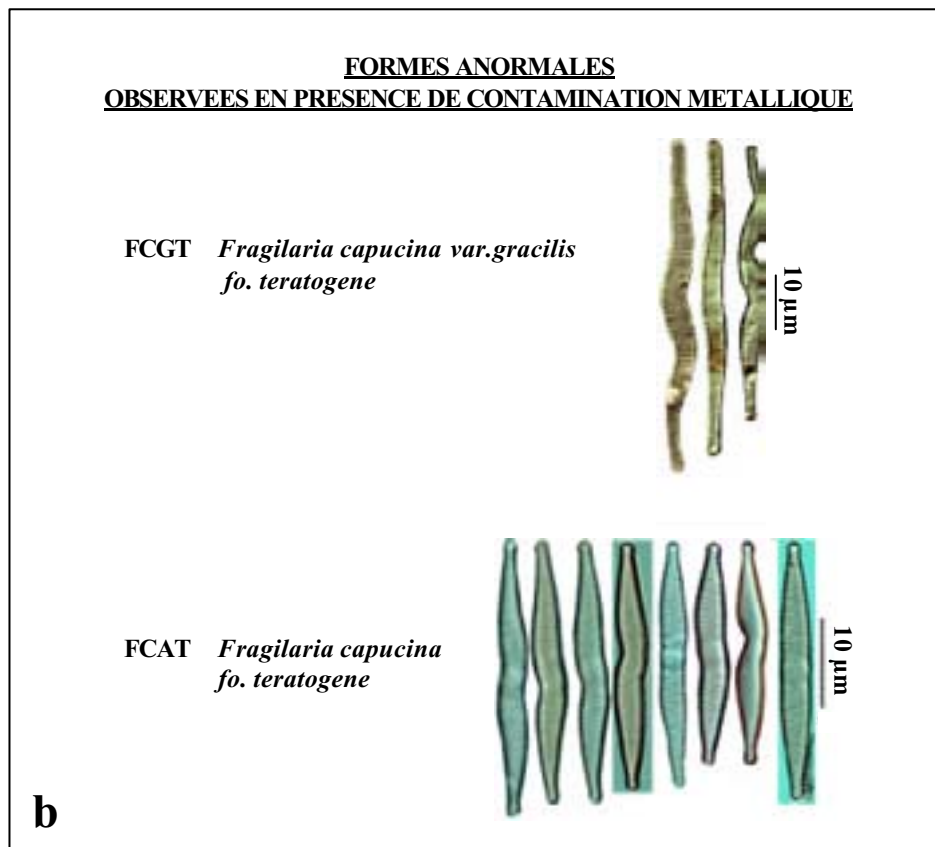


Figure 79 : (a) Diatomées supposées tolérantes ou sensibles à la pollution métallique, et en particulier à la contamination par le cadmium (Cd), d'après les résultats de nos différentes approches expérimentales, et espèces ayant présenté un comportement variable vis-à-vis de la pollution au cours des différentes études.

(b) Microphotographies des formes anormales observées en présence de contamination métallique.

longitudinales et verticales par rapport au plan défini par le support de colonisation). Ces techniques pourraient être appliquées à l'étude des perturbations structurales liées aux métaux.

C- LE DEVELOPPEMENT D'APPROCHES MONOSPECIFIQUES S'AVERE NECESSAIRE POUR EVALUER LES NIVEAUX DE TOLERANCE AUX METAUX DES DIATOMÉES ET ETUDIER LEURS MECANISMES D'ADAPTATION

Les résultats des différentes études que nous avons menées **à l'échelle des communautés** ont permis d'émettre des hypothèses concernant les niveaux de tolérance au Cd de plusieurs espèces de diatomées (**Figure 79**). Ils ont également confirmé le rôle des métaux, et du Cd en particulier, au niveau de la formation de frustules déformés de diatomées, même si ces derniers n'apparaissent qu'en faibles proportions au sein des communautés (< 5 %).

Cependant, la réalisation d'**études monospécifiques** reste le seul moyen d'évaluer le niveau de tolérance "réel" aux métaux des différentes espèces, une fois soustraites aux relations interspécifiques existant au sein des communautés, et dans les conditions contrôlées du laboratoire.

Les résultats de l'expérience monospécifique réalisée sur une culture d'*Achnanthydium minutissimum*, afin d'évaluer les impacts du Cd sur le développement de cette espèce au niveau de substrats artificiels, ont conforté les hypothèses de tolérance aux métaux émises après nos études à l'échelle des communautés, et formulées dans la littérature par de nombreux auteurs.

Le protocole utilisé ayant été validé, des études portant sur d'autres facteurs de contamination (Zn seul, Cd et Zn en mélange, autres métaux comme le mercure, le cuivre, etc.) et sur d'autres espèces de diatomées (ayant notamment présenté une sensibilité à la pollution métallique, d'après les résultats de nos études à l'échelle des communautés), peuvent être envisagées.

Il serait également intéressant de mener des expériences monospécifiques sur des souches de diatomées isolées au niveau de sites naturels présentant différents niveaux de pollution métallique. L'existence de mécanismes d'**adaptation à long-terme aux métaux** chez les diatomées des sites pollués a en effet été mise en évidence par plusieurs auteurs, et confortée par les résultats de notre première expérience de transfert de communautés

périphytiques, réalisée lors des études *in situ* en canaux expérimentaux¹. La comparaison de la tolérance au Cd d'individus de l'espèce *A. minutissimum* provenant de la station "référence", sur la zone en amont du "site-atelier" du Lot, et d'individus de la même espèce collectés au niveau de la station "polluée" du Riou-Mort, permettrait par exemple d'évaluer les capacités d'adaptation à la pollution de cette espèce, et de rechercher ensuite les mécanismes capables d'expliquer cette adaptation (études structurales et ultrastructurales, capacité d'induction de phytochélatines, etc.).

En outre, de tels **systèmes expérimentaux**, parfaitement adaptés aux études à l'échelle des populations de diatomées périphytiques, offrent la possibilité, par la constitution de biofilms monospécifiques, d'étudier et de mieux appréhender les processus complexes qui régissent la pénétration et la toxicité des métaux au sein du périphyton, et qui sont difficiles à évaluer au niveau de biofilms multispécifiques (analyse de la mortalité des cellules après exposition à la pollution de biofilms monospécifiques déjà développés, analyse de la bioaccumulation des métaux par ces biofilms, mesure de l'activité photosynthétique avec des microélectrodes, etc.).

Mentionnons également que d'autres recherches, plus mécanistiques, sont actuellement en cours au LEESA, visant à modéliser les **interactions entre les métaux et les interfaces biologiques des diatomées**. Ces travaux sont menés en collaboration avec l'Equipe de géochimie du LMTG² (UMR CNRS 5563), dans le cadre du programme "Interfaces" de l'ACI Eau et Environnement (Action Concertée Interdisciplinaire, Ministère de la Recherche/CNRS).

De telles recherches présentent un grand intérêt, tant d'un point de vue géochimique qu'environnemental ou écotoxicologique. En effet, les interfaces biologiques³ jouent un rôle déterminant au sein des cycles biogéochimiques des métaux dans les écosystèmes aquatiques, contrôlant les processus de bioaccumulation au niveau des organismes et de transfert le long des chaînes trophiques. Cependant, les propriétés physico-chimiques de ces surfaces d'échange sont encore très mal connues. Les diatomées représentent un modèle particulièrement bien adapté, offrant plusieurs surfaces d'échange en contact avec le milieu aquatique environnant (couche externe ou mucilage, de nature organique ; capsule siliceuse ou frustule ; membrane plasmique). Ces structures sont très variables selon les espèces et selon leur stade de développement, notamment le revêtement polysaccharidique externe. De plus, les diatomées

¹ cf. Partie III-D.2.3.

² LMTG : Laboratoire Mécanismes et Transferts en Géologie.

³ Les **interfaces biologiques** désignent l'ensemble des structures séparant les êtres vivants de leur milieu environnant.

peuvent être produites en culture en grande quantité, lorsque les conditions optimales de croissance sont définies, et peuvent également être fixées sur différents types de support.

Les recherches actuellement mises en œuvre visent à caractériser, au niveau moléculaire, les sites fonctionnels à la surface des enveloppes des diatomées (groupes amines, acides carboxyliques, polysaccharides, phosphates, etc) et, parallèlement, les surfaces d'échange, qui peuvent être extrêmement variables selon l'architecture et l'ornementation des frustules. Tout un ensemble de techniques physico-chimiques et biophysiques sont utilisées par les chercheurs du LMTG : titrations surfaciques, mesures électrocinétiques, expériences d'adsorption et études spectroscopiques, etc. Elles sont appliquées sur des diatomées provenant de cultures monospécifiques réalisées au LEESA, plusieurs espèces ayant été choisies en fonction de leur taille et de leur forme (espèces de petite taille comme *Achnanthydium minutissimum* et *Navicula minima*, espèce filamenteuse comme *Melosira varians* et espèce de taille moyenne comme *Nitzschia dissipata*). Comme nous l'avons mentionné précédemment, des études structurales et ultrastructurales sont développées, afin de caractériser les supports biologiques étudiés, et de rechercher les impacts éventuels des techniques physico-chimiques utilisées pour la caractérisation des interfaces.

La deuxième phase de ce programme de recherche sera consacrée à l'étude de la complexation des métaux sur les surfaces algales, grâce à l'ensemble des techniques développées et à l'application de moyens d'investigation complémentaires, comme par exemple l'autométallographie en microscopie électronique. Les diatomées seront exposées aux métaux dans des conditions expérimentales parfaitement contrôlées, au regard des facteurs biotiques (cultures mono-spécifiques en suspension ou fixées sur différents types de supports), des conditions d'exposition (concentrations des métaux apportés isolément ou en mélange, durée d'exposition, etc.) et des facteurs physico-chimiques (température, pH, intensité lumineuse, alcalinité, etc.), ces derniers agissant simultanément sur la spéciation chimique et la biodisponibilité des métaux et sur les propriétés des interfaces et les capacités d'échange entre les diatomées et leur milieu environnant.

L'étape finale de ces travaux de recherche sera consacrée à l'étude de souches, voire de communautés de diatomées collectées en milieu naturel. Un des mécanismes d'adaptation aux métaux souvent évoqué étant la diminution du nombre de sites de fixation à la surface cellulaire, la quantification de ces sites au niveau de souches de diatomées provenant de sites pollués et de sites non pollués pourrait apporter des données particulièrement intéressantes, les réactions adaptatives conditionnant le maintien de nombreuses espèces face aux variations de la qualité des milieux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**dmiraal, W., Blanck, H., Buckert-De Jong, M., Guasch, H., Ivorra, N., Lehman, V., Nystrom, B.A.H., Paulsson, M. and Sabater, S. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 33(9): 1989-1996.
- A.F.N.O.R.** 2001. Agence française de normalisation. Web site: <http://www.afnor.fr>
- Agence de l'Eau Adour-Garonne.** 1990. Bilan du renforcement du suivi de la qualité des eaux du Lot de 1987 à 1989. 39 pp.
- Ahner, B.A. and Morel, F.M.M.** 1995. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanogr.* 40(4): 658-665.
- Ahner, B.A., Kong, S. and Morel, F.M.M.** 1995. Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnol. Oceanogr.* 40(4): 649-657.
- Andrès, S.** 1997. Etude écotoxicologique des transferts de cadmium et zinc entre la colonne d'eau et les sédiments du Lot (France) et les organismes aquatiques - Approches in situ et expérimentale. PhD thesis, University Paul Sabatier, Toulouse, France, pp. 193.
- Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. and Boudou, A.** 1999. Field transportation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (11): 2462-2471.
- B**aars, J.W.M. 1983. Autoecological investigations on freshwater diatoms. 1. Generation times of some species. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 67(1): 11-18.
- Baudrimont, M.** 1997. Etude du rôle des métallothionéines à l'égard des mécanismes de bioaccumulation du cadmium, du mercure et du zinc par les organismes aquatiques (mollusques bivalves d'eau douce : *Corbicula fluminea*, poissons Cyprinidés) - Approches expérimentales et in situ. PhD thesis, University Bordeaux 1, Bordeaux, France, pp. 202.
- Berland, B.R., Bonin, D.J., Guerin-Ancey, O.J., Kapkov, V.I. and Arlhac, D.P.** 1977. Action of sublethal doses of heavy metals on the growth characteristics of the diatom *Skeletonema costatum*. *Mar. Biol.* 42: 17-30.
- Bernhard, M., Brinckman, F.E., and Sadler, P.J.** 1986. The importance of chemical "speciation" in environmental processes. In: Life Sciences Research Reports, Bernhard, S. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 762-796.
- Besch, W.K., Ricard, M. and Cantin, R.** 1972. Benthic diatoms as indicators of mining pollution in the Northwest Miramichi River System, New Brunswick, Canada. *Int. Rev. Ges. Hydrobio.* 57(1): 39-74.

- Biggs, B.J.F.** 1996. Patterns in benthic algae of streams. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 31-56.
- Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N. and Anschutz, P.** 1999. A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410: 331-341.
- Blanck, H. and Wängberg, S.A.** 1988 a. Validity of an ecotoxicological test system: short-term and long-term effects of arsenate on marine periphyton communities in laboratory systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1807-1815.
- Blanck, H. and Wängberg, S.A.** 1988 b. Induced community tolerance in marine periphyton established under arsenate stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1816-1819.
- Blanck, H., Wängberg, S.-A. and Molander, S.** 1988. Pollution-Induced Community Tolerance – A new ecotoxicological tool. In: *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*, ASTM STP 988, Cairns, J. Jr., Pratt, J.R., (Eds.), *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, pp. 219-230.
- Blandin, P.** 1986. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'Ecologie* 17: 215-307.
- Bothwell, M.L., Suzuki, K.E., Bolin, M.K. and Hardy, F.J.** 1989. Evidence of dark avoidance by phototrophic periphytic diatoms in lotic systems. *J. Phycol.* 25: 85-94.
- Boutier, B., Chiffolleau, J.-F., Gonzalez, J.-L., Lazure, P., Auger, D. and Truquet, I.** 2000. Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters: consequences on the Marennes-Oléron bay (France). *Oceanologica Acta* 23(7): 745-757.
- Bourelly, P.** 1981. Les algues d'eau douce. Vol. II: Les algues jaunes et brunes. Boubée et C^{ie}, Paris, 518 p.
- Braek, G.S., Malnes, G. and Jensen, A.** 1980. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. IV. Combined effect of zinc and cadmium on growth and uptake in some marine diatoms. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 42: 39-54.
- C**ampbell, P.G.C., Lewis, A.G., Chapman, P.M., Crowder, A.A., Fletcher, W.K., Imber, B., Luoma, S.N., Stokes, P.M. and Winfrey, M. 1988. Biologically available metals in sediments. *National Research Council Canada* (Ottawa), Rapport n° 27694.
- Chang, S.I. and Reinfelder, J.R.** 2000. Bioaccumulation, subcellular distribution and trophic transfer of copper in a coastal marine diatom. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4931-4935.
- Colwell, F.S., Hornor, S.G. and Cherry, D.S.** 1989. Evidence of structural and functional adaptation in epilithon exposed to zinc. *Hydrobiologia* 171: 79-90.
- Conway, H.L.** 1978. Sorption of arsenic and cadmium and their effects on growth, micronutrient utilization, and photosynthetic pigment composition of *Asterionella Formosa*. *J. Fish. Res. Board. Can.* 35: 286-294.

- Conway, H.L. and Williams, S.C.** 1979. Sorption of cadmium and its effect on growth and the utilization of inorganic carbon and phosphorus on two freshwater diatoms. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35: 286-294.
- Coste, M.** 1978. Sur l'utilisation des diatomées benthiques pour l'appréciation de la qualité des eaux courantes. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Université de Besançon, N° 287, 143 p.
- Coste, M.** 1994. Sur l'utilisation des diatomées dans le diagnostic biologique de la qualité des eaux courantes : intérêts et limites des indices. In: Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques. Séminaire national, Paris, pp. 1-15.
- Coste, M.** 1998. Mise au point d'un indice diatomique pratique applicable au réseau hydrographique français. Tome 2 : Manuel de l'utilisateur. *Etude Cemagref Bordeaux* N°31, 102 p.
- Coste, M. and Ayphasshoro, H.** 1991. Etude de la qualité des eaux du bassin Artois-Picardie à l'aide des communautés de diatomées benthiques : application des indices diatomiques. *Rapport pour l'Agence de l'eau Artois Picardie, Cemagref Bordeaux*, N°90X3300, 227 p.
- Coste, M., Lenoir, A. and Huet, F.** 1995. Evaluation de la qualité des eaux de 71 stations du bassin Adour-Garonne à l'aide des communautés de Diatomées benthiques. *Rapport pour l'agence de l'eau Adour-Garonne*, N°E/12/93, Cemagref Bordeaux, 91 p.
- Cox, E.J.** 1993. Freshwater diatom ecology: developing an experimental approach as an aid to interpreting field data. *Hydrobiologia* 269/270: 447-452.
- Crossey, M.J. and La Point, T.W.** 1988. A comparison of periphyton community structural and functional responses to heavy metals. *Hydrobiologia* 162: 109-121.
- Dauta, A.** 1982. Conditions de développement du phytopl. *Anal. Limnol.* 18: 217-268.
- De Filippis, L.F. and Pallaghy, C.K.** 1994. Heavy metals: sources and biological effects. *Archiv für Hydrobiologie* 42: 31-77.
- De Nicola, D.M.** 1996. Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 150-183.
- Deniseger, J., Austin, A. and Lucey, W.P.** 1986. Periphyton communities in a pristine mountain stream above and below metal mining operations. *Freshwater Biol.* 16: 209-218.
- Depledge, M.H., Weeks, J.M. and Bjerregaard, P.** 1994. Heavy metals. In: *Handbook of Ecotoxicology*, Calow, P. (Eds.), Blackwell Scientific Publications, London, pp. 79-104.

Descy, J. and Coste, M. 1991. A test of methods for assessing water quality based on diatoms. *Ver. Int. Verein. Theor. angewandte Limnol.* 24: 2112-2116.

Dickman, M.D. 1998. Benthic marine diatom deformities associated with contaminated sediments in Hong Kong. *Environ. Int.* 24(7): 749-759.

Dongmann, G. and Nürnberg, H.W. 1982. Observations with *Thalassiosira rotula* (Meunier) on the toxicity and accumulation of cadmium and nickel. *Ecotox. Environ. Safe.* 6: 535—544.

Eichenberger, E., Schlatter, F., Weilenmann, H. and Wuhrmann, K. 1981. Toxic and eutrophicating effects of Co, Cu and Zn on algal benthic communities in rivers. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21: 1131-1134.

Fayolle, S., Cazaubon, A., et Comte, K. 1999. Réponses et stratégies d'adaptation des communautés algales épilithiques à différents régimes hydrologiques. *C.R.Acad.Sci.* (Série III) 322: 413-422.

Fisher, N.S. and Jones, G.J. 1981. Effects of copper and zinc on growth, morphology, and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 51: 37-56.

Foster, P.L. 1982. Species associations and metal contents of algae from rivers polluted by heavy metals. *Freshwater Biol.* 12: 17-39.

Freeman, C. and Lock, M.A. 1995. The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnol. Oceanogr.* 40(2): 273-278.

Genter, R.B. 1996. Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 404-468.

Genter, R.B. and Amyot, D.J. 1994. Freshwater benthic algal population and community changes due to acidity and aluminium-acid mixtures in artificial streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 13(3): 369-380.

Genter, R.B. and Lehman, R.M. 2000. Metal toxicity inferred from algal population density, heterotrophic substrate use, and fatty acid profile in a small stream. *Environ. Tox. Chem.* 19(4): 869-878.

Genter, R.B., Cherry, D.S., Smith, E.P. and Cairns, J.Jr. 1987. Algal-periphyton population and community changes from zinc stress in stream mesocosms. *Hydrobiologia* 153: 261-275.

Germain, H. 1981. Flore des diatomées. Diatomophycées eaux douces et saumâtres du Massif Armoricaïn et des contrées voisines d'Europe occidentale. Boubée Ed., Paris. 444 p.

- Ghosh, M. and Gaur, J.P.** 1998. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities. *Aquat. Bot.* 60: 1-10.
- Gray, B.R. and Hill, W.R.** 1995. Nickel sorption by periphyton exposed to different light intensities. *J. N. Benthol. Soc.* 14(2): 299-305.
- Gray, B.R., Hill, W.R. and Stewart, A.J.** 2001. Effects of development time, biomass and ferromanganese oxides on nickel sorption by stream periphyton. *Env. Poll.* 112: 61-71.
- Guanzon, N.G., Nakahara, H.Jr and Yoshida, Y.** 1994. Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fisheries Sci.* 60(4): 379-384.
- Guanzon, N.G.Jr, Nakahara, H. and Nishimura, K.** 1995. Accumulation of copper, zinc, cadmium, and their combinations by three freshwater microalgae. *Fisheries Sci.* 61(1): 149-156.
- Gustavson, K. and Wängberg, S.A.** 1995. Tolerance induction and succession in microalgae communities exposed to copper and atrazine. *Aquatic Toxicology* 32: 283-302.
- H****arding, J.P.C. and Whitton, B.A.** 1976. Resistance to zinc of *Stigeoclonium tenue* in the field and the laboratory. *Br. phycol. J.* 11: 417-426.
- Hill, W.R.** 1996. Factors affecting benthic algae. Effects of light. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 121-149.
- Hill, B.H., Willingham, W.T., Parrish, L.P., McFarland, B.H., 2000 a.** Periphyton community responses to elevated metal concentrations in a Rocky Mountain stream. *Hydrobiologia* 428, 161-169.
- Hill, B.H., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R., Stevenson, R.J., McCormick, F.H. and Johnson, C.B.** 2000 b. Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 19: 50-67.
- Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R. and Roemer, S.C.** 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.* 29: 537-566.
- Humphrey, K.P., and Stevenson, R.J.** 1992. Responses of benthic algae to pulses in current and nutrients during simulations of subscouring spates. *J. North. Amer. Benthol. Soc.* 11: 37-48.
- Hustedt, F.** 1930. Die Kieselalgen Deutschlands, österreichs und der Schweiz mit berücksichtigung der übrigen länder europas sowie der angrenzenden meeresgebiete. In: *Kryptogamen-Flora*, Rabenhorst, L. Ed., Leipzig, pp. 785-925.

- I**l'yash, L.V., Belevich, T.A. and Yashina, E.V. 1997. Effect of cadmium on the dynamics of the biomass of marine plankton algae with different life strategies. *Biol. Bull.* 24(5): 515-519.
- Iserentant, R. and Blancke, D.** 1984. A transplantation experiment in running water to measure the response rate of diatoms to changes in water quality. In: *Proceedings of the 8th International Diatom Symposium*, Paris, 1984, Ricard, M., (Eds), Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Ivorra, N., Hettelaar, J., Tubbing, G.M.J., Kraak, M.H.S., Sabater, S. and Admiraal, W.** 1999. Translocation of microbenthic assemblages used for *in situ* analysis of metal pollution in rivers. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 19-28.
- Ivorra, N., Bremer, S., Guasch, H., Kraak, M.H.S. and Admiraal, W.** 2000 a. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ. Toxic. Chem.* 19(5): 1332-1339.
- Ivorra, N., Barranguet, C., Jonker, M., Kraak, M.H.S., Admiraal, W.** 2000 b. Differences in Zn tolerance in strains of the freshwater microbenthic diatom *Gomphonema parvulum* (Bacillariophyceae). In: Metal induced succession in benthic diatom consortia, PhD thesis, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. 163 p.
- J**ensen, A. and Rystad, B. 1974. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. I. The tolerance of three algal species to zinc in a coastal sea water. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 15: 145-157.
- Jin, X., Nalewajko, C. and Kushner, D.J.** 1996. Comparative study of nickel toxicity to growth and photosynthesis in nickel-resistant and nickel-sensitive strains of *Scenedesmus acutus f. alternans* (Chlorophyceae). *Microb. Ecol.* 31: 103-14.
- Johnson, R.E., Tuchman, N.C. and Peterson, C.G.** 1997. Changes in the vertical microdistribution of diatoms within a developing periphyton mat. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 16(3): 503-519.
- Joliffe, I.T.** 1986. Principal component analysis. New York, Springer-Verlag.
- Jouanneau, J.M., Boutier, B., Chiffoleau, J.F., Latouche, C. and Philips, I.** 1990. Cadmium in the Gironde fluvioestuarine system: behaviour and flow. *Sci. Tot. Environ.* 98: 465-479.
- Jozereau, C.** 1997. La production de zinc dans la vallée du Lot depuis le XIX^{ème} siècle. Conséquences sur l'environnement. Rapport de stage de Maîtrise de Sciences de l'Environnement, option Océanologie, Université Bordeaux 1.
- K**aufman, L.H. 1982. Stream aufwuchs accumulation: disturbance frequency and stress resistance and resilience. *Oecologia* 52: 57-63.

- Kelly, M.G. and Whitton, B.A.** 1995. The trophic diatom index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *J. Appl. Phycol.* 7: 433-444.
- Kelly, M.G.** 1998. Use of the trophic index to monitor eutrophication in rivers. *Water Res.* 32: 236-242.
- Kraepiel, A.M.L., Chiffoleau, J.F., Martin, J.M. and Morel, F.M.M.** 1997. Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 61: 1421-1436.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H.** 1986. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: *Bacillariophyceae. Teil 1. Naviculaceae*, Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H.** 1988. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: *Bacillariophyceae. Teil 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*, Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H.** 1991 a. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: *Bacillariophyceae. Teil 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*, Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Krammer, K. and Lange-Bertalot, H.** 1991 b. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. In: *Bacillariophyceae. Teil 4. Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*, Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D., (Eds), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Lampkin, A.J. and Sommerfeld, M.R.** 1982. Algal distribution in a small, intermittent stream receiving acid-mine drainage. *J. Phycol.* 18: 196-199.
- Lange-Bertalot, H.** 1979. Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. *Nova Hew.* 64: 285-304.
- Lapaquellerie, Y., Jouanneau, J.M., Maillet, N. and Latouche, C.** 1995. Cadmium pollution in sediments of the Lot River France, estimate of the mass of cadmium. *Environ. Technol.* 16: 1145-1154.
- Latouche, C.** 1997. Suivi de l'évolution des flux de cadmium dans le Lot et dans la Garonne. *Rapport du Département de Géologie et Océanographie - U.R.A. C.N.R.S.* 197, Université Bordeaux 1.
- Lecointe, C., Coste, M. and Prygiel, J.** 1993. "OMNIDIA" software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269/270: 509-513.
- Lee, J.G., Roberts, S.B. and Morel, F.M.M.** 1995. Cadmium: a nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.* 40(6): 1056-1063.

- Lee, J.G., Ahner, B.A. and Morel, F.M.M.** 1996. Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environ. Sci. Technol.* 30(6): 1814-1821.
- Lehman, V., Tubbing, G.M. and Admiraal, W.** 1999. Induced metal tolerance in microbenthic communities from three lowland rivers with different metal loads. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 384-391.
- Leland, H. and Carter, J.L.** 1984. Effects of copper on species composition of periphyton in a Sierra Nevada, California, stream. *Freshwater Biol.* 14: 281-296.
- Lindström, E.A. and Rorslett, B.** 1991. The effects of heavy metal pollution on periphyton in a Norwegian soft-water river. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 2215-2219.
- Lock, M.A., Wallace, R.R., Costerton, J.W., Ventullo, R.M. and Charlton, S.E.** 1984. River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos* 42: 10-22.
- Lowe, R.L. and Pan, Y.** 1996. Benthic algal communities as biological monitors. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 705-739.
- Luttenton, M.R. and Rada, R.G.** 1986. Effects of disturbance on epiphytic community architecture. *J. Phycol.* 22: 320-326.
- McCormick, P.V. and Cairns, J. Jr** 1994. Algae as indicators of environmental change. *J. Appl. Phycol.* 6: 509-526.
- McFarland, B.H., Hill, B.H. and Willingham, W.T.** 1997. Abnormal *Fragilaria* spp. (Bacillariophyceae) in streams impacted by mine drainage. *J. Freshwater Ecol.* 12(1): 141-149.
- McIntire, C.D., Gregory, S.V., Steinman, A.D. and Lamberti, G.A.** 1996. Modelling algal communities: an example from stream ecology. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 669-704.
- Medley, C.N. and Clements, W.H.** 1998. Responses of diatom communities to heavy metals in streams: the influence of longitudinal variation. *Ecological Applications* 8(3): 631-644.
- Meir, P.G., O'Connor, D. and Dilks, D.** 1983. Artificial substrata for reducing periphytic variability on replicated samples. In: Wetzels, R.G. (Eds.), *Periphyton of freshwater ecosystems*, Junk, The Hague, pp. 283-286.
- Monteiro, M.T., Oliveira, R. and Vale, C.** 1995. Metal stress on the plankton communities of Sado River (Portugal). *Wat. Res.* 29(2): 695-701.
- Morelli, E. and Scarano, G.** 1995. Cadmium induced phytochelatin in marine alga *Phaeodactylum tricorutum*: effect of metal speciation. *Chem. Spec. Bioavailab.* 7(2): 43-47.

- Morelli, E. and Pratesi, E.** 1997. Production of phytochelatins in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* in response to copper and cadmium exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 657-664.
- Morelli, E. and Scarano, G.** 2001. Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Marine Environmental Research* 52: 383-395.
- Moriarty, F.** 1983. *Ecotoxicology*. Academic Press, London. 233 p.
- Müller, U.** 1999. The vertical zonation of addressed diatoms and other epiphytic algae on *Phragmites australis*. *Eur. J. Phycol.* 34: 487-496.
- Newman, M.C., Alberts, J.J. and Greenhut, V.A.** 1985. Geochemical factors complicating the use of aufwuchs to monitor bioaccumulation of arsenic, cadmium, chromium, copper and zinc. *Water Res.* 19(9): 1157-1165.
- Niederlehner, B.R. and Cairns, J.Jr.** 1992. Community response to cumulative toxic impact: effect of acclimation on zinc tolerance of aufwuchs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 2155-2163.
- Nriagu, J.O.** 1996. A history of global metal pollution. *Science*, 272: 223-224.
- Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M.** 1988. Quantitative assessment of worldwilde contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333: 134-139.
- Oemke, M.P. and Burton, T.M.** 1986. Diatom colonization dynamics in a lotic system. *Hydrobiologia* 139: 153-166.
- Patrick, R.** 1971. The effects of increasing light and temperature on the structure of diatom communities. *Limnol. Oceanogr.* 16: 405-421.
- Paulsson, M., Nyström, B. and Blanck, H.** 2000. Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Göta Älv, based on a microcosm study. *Aquatic Toxicology* 47: 243-257.
- Payne, C.D. and Price, N.M.** 1999. Effects of cadmium toxicity on growth and elemental composition of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 35: 293-302.
- Pérés, F.,** 1996. Etude des effets de quatre contaminants – herbicide (Isoproturon), dérivés du mercure (mercure inorganique, méthylmercure), cadmium – sur les communautés de diatomées péiphytiques au sein de microcosmes d'eau douce. PhD thesis, University Paul Sabatier de Toulouse, Toulouse, France.
- Pérés, F., Coste, M., Ricard, M., Boudou, A. and Ribeyre, F.** 1995. Effets des métaux lourds (Cd, Hg) sur les communautés de diatomées péiphytiques développées sur des substrats artificiels en microcosmes. *Vie Milieu* 45 (3/4): 219-230.

- Péres, F., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M. and Boudou, A.** 1996. Effects of methylmercury and inorganic mercury on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *J. Appl. Phycol.* 9: 215-227.
- Péres, F., Florin, D., Grollier, T., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Ribeyre, F., Ricard, M. and Boudou, A.** 1996. Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms. *Environmental Pollution* 94(2): 141-152.
- Prygiel, J. and Coste, M.** 1995. Les diatomées et le diagnostic de la qualité des eaux continentales : les principales méthodes indicelles. *Vie et milieu* 45(3/4) : 179-186.
- Prygiel, J., Whitton, B.A. and Bukowska, J.** 1999. Use of Algae for Monitoring Rivers III. Prygiel, J., Whitton, B.A. and Bukowska, J. *Agence de l'Artois-Picardie*, Douai, France, J. Prygiel Publisher.
- Prygiel, J. and Coste, M.** 2000. Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées, NF T90-354. *Document Agences de l'Eau*, MATE, Cemagref Bordeaux. 134 p. + 1 cédérom.
- Rachlin, J.W., Jensen, T.E. and Warkentine, B.** 1983. The growth response of the diatom *Navicula incerta* to selected concentrations of the metals: cadmium, copper, lead and zinc. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 110(2): 217-223.
- Rai, L.C., Gaur, J.P. and Kumar, H.D.** 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol. Rev.* 56: 99-151.
- Reese, M.J.** 1937. The microflora of the non-calcareous streams Rheidol and Melindwr with special reference to water pollution from lead mines in Cardiganshire. *J. Ecol.* 25: 386-407.
- RNO.** 1995. Surveillance du Milieu Marin. *Bulletin du RNO*, IFREMER, 32 p.
- Robinson, C.T. and Rushforth, S.R.** 1987. Effects of physical disturbance and canopy cover on attached diatom community structure in an Idaho stream. *Hydrobiologia* 154: 49-59.
- Roch, M., Nordin, R.N., Austin, A., McKean, C.J.P., Denieseger, J., Kathman, R.D., McCarter, J.A. and Clark, M.J.R.** 1985. The effects of heavy metal contamination on the aquatic biota of Buttle Lake and the Campbell River drainage (Canada). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14: 347-362.
- Roemer, S.C., Hoagland, K.D. and Rosowski, J.R.** 1984. Development of a freshwater periphyton community as influenced by diatom mucilages. *Can. J. Bot.* 62: 1799-1813.
- Rose, F.L. and Cushing, C.E.** 1970. Periphyton: autoradiography of zinc-65 adsorption. *Science* 68: 576-577.

- Rosemond, A.D., Mulholland, P.J. and Brawley, S.H.** 2000. Seasonally shifting limitation of stream periphyton: response of algal populations and assemblage biomass and productivity to variation in light, nutrients and herbivores. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 66-75.
- Round, F.E.** 1981. *The Ecology of Algae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Round, F.E., Crawford, R.M. and Mann, D.G.** 1990. *The Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge Univ. Press, 747 p.
- Rushforth, S.R., Brotherson, J.D., Fungladda, N. and Evenson, W.E.** 1981. The effect of dissolved heavy metals on attached diatoms in the Uintah Basin of Utah, U.S.A. *Hydrobiologia* 83: 313-323.
- Sabater, S.** 2000. Diatom communities as indicators of environmental stress in the Guardamar River, S-W. Spain, following a major mine tailings spill. *J. Appl. Phycol.* 12(2): 113-124.
- Say, P.J.** 1978. The Riou-Mort, a tributary to the river Lot polluted by heavy metals. I. Preliminary observations on the chemistry and benthic algae. *Annals Limnol.* 14(1-2): 113-131.
- Say, P.J. and Whitton, B.A.** 1980. Changes in flora down a stream showing a zinc gradient. *Hydrobiologia* 76: 255-262.
- Say, P.J., Diaz, B.M. and Whitton, B.A.** 1977. Influence of zinc on lotic plants. I. Tolerance of *Hormidium* species to zinc. *Freshwater Biology* 7: 357-376.
- Schmitt, D., Müller, A., Csögör, Z., Frimmel, F.H. and Posten, C.** 2001. The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. *Wat. Res.* 3: 779-785.
- Shannon, C.E. and Weaver, W.** 1948. *The mathematical theory of communication*. Univ. Illinois Press, Urbana, 125 p.
- Simkiss, K. and Taylor, M.G.** 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Aquat. Sci.* 1(1): 173-188.
- Simon, O.** 2000. Etudes des voies de contamination – directe et trophique – des organismes aquatiques continentaux par les métaux –Mercure, Cadmium, Zinc – Approches expérimentales au laboratoire et *in situ*. PhD thesis, University Bordeaux 1, Bordeaux, France, pp. 172.
- Sladeczek, V.** 1986. Diatom as indicators of organic pollution. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 14: 555-566.
- Soldo, D. and Behra, R.** 2000. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47: 181-189.

- Sorentino, C.** 1979. The effects of heavy metals on phytoplankton – A review. *Phykos* 18(1&2): 149-161.
- Stauber, J.L. and Florence, T.M.** 1989. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Water. Res.* 23(7): 907-977.
- Steinman, A.D.** 1996. Effects of grazers on freshwater benthic algae. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 341-373.
- Steinman, A.D. and McIntire, C.D.** 1986. Effects of current velocity and light energy on the structure of periphyton assemblages in laboratory streams. *J. Phycol.* 22: 352-361.
- Stevenson, R.J.** 1983. Effects of current and conditions simulating autogenically changing microhabitats on benthic diatom immigration. *Ecology* 64(6): 1514-1524.
- Stevenson, R.J.** 1996. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. In: *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology Series, Stevenson, R.J., Bothwell, M.L., Lowe, R.L., (Eds.), Academic Press, Boston, pp. 3-30.
- Stevenson, R.J. and Bahls, L.L.** 1999. Rapid bioassessment protocols for use in streams and rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish. 6. Periphyton protocols. Web site *USA Environmental Protection Agency (EPA)*: www.epa.gov/owow/wtr1/monitoring/rbp/ch06main.html
- Stevenson, R.J., Peterson, C.G., Kirschtel, D.B., King, C.C. and Tuchman, N.C.** 1991. Density-dependant growth, ecological strategies, and effects of nutrients and shading on benthic diatom succession in streams. *J. Phycol.* 27: 59-69.
- Sunda, W.G. and Huntsman, S.A.** 1998. Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 32 : 2961-2968.
- Takamura, N., Kasai, F. and Watanabe, M.M.** 1989. Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *J. Appl. Phycol.* 1: 39-52.
- Takamura, N., Hatakeyama, S. and Sugaya, Y.** 1990. Seasonal changes in species composition and production of periphyton in an urban river running through an abandoned copper mining region. *Jpn. J. Limnol.* 51(4): 225-235.
- Ter Braak, C.J.F. and Van Dam, H.** 1989. Inferring pH from diatoms: a comparison of old and new calibration methods. *Hydrobiologia* 178: 209-223.
- Torres, E., Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C. and Abalde, J.** 1997. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol.* 39: 231-246.

- U.S. E.P.A.** 2001. Water pollution legal aspects, Monitoring water quality. Web site: <http://www.epa.gov>
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. and Jahns, H.M.** 1995. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 133-159.
- Wang, W.** 1986. Acclimation and response of algal communities from different sources to zinc toxicity. *Water Air Soil Poll.* 28: 335-349.
- Wang, W.X. and Dei, R.C.H.** 2001. Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). *Wat. Res.* 35(1): 315-321.
- Weber, C.I. and McFarland, B.H.** 1981. Effects of copper on the periphyton of a small calcareous stream. Ecological assessments of effluent impacts on communities and indigenous aquatic organisms. ASTM STP 730. J.M. Bates and C.I. Weber Eds. *American Society for Testing and Materials*, pp. 101-131.
- Werner, D.** 1977. The Biology of Diatoms, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Whitton, B.A.** 1980. River Ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne.
- Whitton, B.A. and Rott, E.** 1996. Use of Algae for Monitoring Rivers II. Whitton, B.A., Rott, E. (Eds.). Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria, E. Rott Publisher.
- Whitton, B.A., Rott, E. and Friedrich, G.** 1991. Use of Algae for Monitoring Rivers. Whitton, B.A., Rott, E., Friedrich, G. (Eds.). Institut für Botanik, Universität Innsbruck, Innsbruck, Austria, E. Rott Publisher.
- William, L.G. and Mount, D.I.** 1965. Influence of Zn on periphyton communities. *Am. J. Bot.* 52: 26-34.
- Wong, P.T.S.** 1987. Toxicity of cadmium to freshwater microorganisms, phytoplankton and invertebrates. In Nriagu, J.O. and Sprague, J.B. Ed.: Cadmium in the aquatic environment. J. Wiley, New-York, pp. 117-137.
- Wong, P.T.S., Burnison, G. and Chau, Y.K.** 1979. Cadmium toxicity to freshwater algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 487-490, 1979.
- Wong, P.T.S., Chau, Y.K. and Patel, D.** 1982. Physiological and biochemical responses of several freshwater algae to a mixture of metals. *Chemosphere* 11(4): 367-376.

ANNEXES

ANNEXE I

**LISTE DES DIATOMEES CITEES DANS LE MEMOIRE
ET DES ABBREVIATIONS UTILISEES**

LISTE DES DIATOMÉES CITÉES DANS LE MÉMOIRE

AATO	<i>Achnanthes atomus</i> Hustedt
ACTT	<i>Achnanthes catenata</i> Bily & Marvan
ACUR	<i>Achnanthes curtissima</i> Carter
ALFR	<i>Achnanthes lanceolata</i> (Breb.) Grun. <i>ssp. frequentissima</i> Lange-Bertalot
AMIN	<i>Achnantheidium minutissimum</i> Kutzing <i>v. minutissima</i> Kutzing
APED	<i>Amphora pediculus</i> (Kutzing) Grunow
AFOR	<i>Asterionella formosa</i> Hassall
AAMB	<i>Aulacoseira ambigua</i> (Grun.) Simonsen
CPLA	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg <i>var. placentula</i>
CPLE	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg <i>var. euglypta</i> (Ehr.) Grunow
CPLI	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg <i>var. lineata</i> (Ehr.) Van Heurck
CPPL	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg <i>var. pseudolineata</i> Geitler
CDUB	<i>Cyclostephanos dubius</i> (Fricke) Round
CINV	<i>Cyclostephanos invisitatus</i> (Hohn & Hellerman) Theriot Stoermer & Hakansson
CMEN	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kutzing
CSTE	<i>Cyclotella stelligera</i> Cleve et Grun in Van Heurck
CAFF	<i>Cymbella affinis</i> Kutzing
CTUM	<i>Cymbella tumida</i> (Brebisson) Van Heurck
DVUL	<i>Diatoma vulgare</i> Bory 1824
ENMI	<i>Encyonema minutum</i> (Hilse in Rabh.) D.G. Mann
FCAP	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres <i>var. capucina</i>
FCAT	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres <i>var. capucina fo. teratogene</i>
FCGT	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres <i>var. gracilis</i> (Oestrup) Hustedt <i>fo. teratogene</i>
FCVA	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazieres <i>var. vaucheriae</i> (Kutzing) Lange-Bertalot
FCRO	<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton
FULN	<i>Fragilaria ulna</i> (Nitzsch.) Lange-Bertalot <i>var. ulna</i>
FRAM	<i>Frustulia rhomboids</i> (Ehr.) De Toni <i>var. amphipleuroides</i> (Grunow) De Toni
GMMI	<i>Gomphoneis minuta</i> (Stone) Kociolek & Stoermer <i>var. minuta</i>
GPAP	<i>Gomphonema parvulum</i> Kutzing <i>var. parvulum f. parvulum</i>
GYAT	<i>Gyrosigma attenuatum</i> (Kutz.) Cleve
GNOD	<i>Gyrosigma nodiferum</i> (Grunow) Reimer
MVAR	<i>Melosira varians</i> Agardh
NCPR	<i>Navicula capitatoradiata</i> Germain
NCRY	<i>Navicula cryptocephala</i> Kutzing
NCTE	<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot
NCTO	<i>Navicula cryptotenelloides</i> Lange-Bertalot
NGRE	<i>Navicula gregaria</i> Donkin
NLAN	<i>Navicula lanceolata</i> (Agardh) Ehrenberg
NMEN	<i>Navicula menisculus</i> Schumann <i>var. menisculus</i>
NMIN	<i>Navicula minima</i> Grunow
NMLF	<i>Navicula molestiformis</i> Hustedt
NRCH	<i>Navicula reichardtiana</i> Lange-Bertalot <i>var. reichardtiana</i>
NRHY	<i>Navicula rhynchocephala</i> Kutzing
NTPT	<i>Navicula tripunctata</i> (O.F.M.) Bory
NVGE	<i>Navicula viridula var. germanii</i> (Wallace) Lange-Bertalot
NVRO	<i>Navicula viridula</i> (Kutz.) Ehr. <i>var. rostellata</i> (Kutz.) Cleve

NCOT *Nitzschia constricta* (Kutzing) Ralfs
NDIS *Nitzschia dissipata* (Kutzing) Grunow var.*dissipata*
NFON *Nitzschia fonticola* Grunow in Cleve et Möller
NFBU *Nitzschia frustulum* (Kutzing) Grunow var. *bulnheimiana* (Rabenhorst) Grunow
NLIN *Nitzschia linearis* (Agardh) W.M.Smith var.*linearis*
NPAL *Nitzschia palea* (Kutzing) W.Smith
NSIT *Nitzschia sinuata* (Thwaites) Grunow var.*tabellaria* Grunow
PGLO *Pinnularia globiceps* Gregory
PMIC *Pinnularia microstauron* (Ehr.) Cleve
RABB *Rhoicosphenia abbreviata* (C.Agardh) Lange-Bertalot
SSEM *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G. Mann
SANG *Surirella angusta* Kutzing
SBRE *Surirella brebissonii* Krammer & Lange-Bertalot var.*brebissonii*
TPSN *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal

ANNEXE II

Communications orales à des congrès scientifiques

- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. and Boudou, A. (1999). Impact des métaux lourds (Cd, Zn) sur les communautés de diatomées périphtiques de l'hydrosystème Lot en conditions hivernales. XVIII colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaf), 14-17 septembre 1999, Nice, France.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. and Boudou, A. (2000). Impact des métaux lourds (Cd, Zn) sur les communautés de diatomées périphtiques de l'hydrosystème Lot (France). XIX colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaf), 12-15 septembre 2000, Mont-Rigi, Belgique.

Communications affichées à des congrès scientifiques

- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. and Boudou, A. (1999). Effets de la pollution métallique (Cd, Zn) sur les communautés de diatomées périphtiques du Lot. Congrès de l'Association Française de Limnologie-Océanographie (AFL), 7-10 septembre 1999, Bordeaux, France.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. and Boudou, A. (2000). Effects of metallic pollution (Cd, Zn) on the periphytic diatoms communities using outdoor experimental streams. Third Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) World Congress, 21-25 may 2000, Brighton, United Kingdom.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M. and Boudou, A. (2001). Use of indoor experimental streams to assess structural effects of cadmium (Cd) on periphytic diatoms communities. 11^o Annual Meeting of the European Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 6-10 may 2001, Madrid, Spain.

Communication orale

Impact des métaux lourds (Cd, Zn) sur les communautés de diatomées périphytiques de l'hydrosystème Lot en conditions hivernales

Caroline Gold */**, Agnès Feurtet-Mazel **, Michel Coste * et Alain Boudou **

* Cemagref de Cestas, UR Qualité des Eaux, 50 avenue de Verdun, 33630 Cestas

** Laboratoire LEESA, UMR CNRS EPOC 5805, Université Bordeaux 1, Place Peyneau, 33120 Arcachon

Les communautés de diatomées périphytiques de la rivière Lot (Sud-Ouest de la France) et du Riou-Mort, petit affluent fortement contaminé en métaux (Cd et Zn), ont été étudiées au mois de décembre 1998.

Trois stations d'étude ont été retenues : 2 stations sur le Lot, en amont (site de référence) et en aval (pollution faible) de la confluence avec le Riou-Mort ; 1 station sur le Riou-Mort (pollution forte). Les facteurs physico-chimiques et les niveaux de contamination de la colonne d'eau ont été mesurés durant toute l'expérience. La température des eaux a présenté de grandes variations entre les stations d'étude, avec des valeurs beaucoup plus élevées sur le Riou-Mort en raison du fonctionnement d'une centrale thermique.

Des canaux artificiels, alimentés en continu par l'eau de la rivière et contenant des substrats artificiels (lames de verre), ont permis un échantillonnage des communautés périphytiques en conditions semi-contrôlées. La cinétique de colonisation des substrats a été suivie durant 4 semaines sur les 3 stations, et la translocation d'une partie des canaux depuis le site de référence vers les stations contaminées, après 2 semaines de colonisation, a permis d'analyser les changements structuraux des communautés périphytiques liés à l'introduction de métaux, à partir de la détermination de la densité des diatomées et des abondances relatives des différentes espèces.

Les résultats montrent que la croissance des diatomées est inhibée après 2 semaines de colonisation sur le Riou-Mort (densités $< 40\ 000$ cellules/cm²), alors qu'elle suit une cinétique exponentielle très rapide sur les 2 stations du Lot (densités $> 100\ 000$ cellules/cm² après 4 semaines). En ce qui concerne la composition spécifique des communautés de diatomées, elle est marquée par la dominance des espèces *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata* sur les 2 stations du Lot, alors que les espèces ont des abondances relatives assez homogènes sur le Riou-Mort. De plus, des frustules anormaux de l'espèce *Fragilaria crotonensis* var. *gracilis* ont été observés dans les stations polluées, avec des abondances relatives augmentant suivant le niveau de pollution et le temps d'exposition.

Ces expérimentations de terrain nous ont conduit à observer des communautés de diatomées périphytiques totalement différentes sur le Riou-Mort, pollué par le Cd et le Zn. Cependant, la variabilité des températures observée entre les stations ne permet pas de conclure sur l'effet des métaux lourds. Des expériences de laboratoire sont en cours de réalisation, afin d'évaluer les effets de la pollution métallique dans des conditions contrôlées.

XIX colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaf)

12-15 septembre 2000, Mont-Rigi, Belgique.

Communication orale

Impact des métaux lourds (Cd, Zn) sur les communautés de diatomées périphytiques de l'hydrosystème Lot (France)

Caroline Gold */**, Agnès Feurtet-Mazel **, Michel Coste * et Alain Boudou **

* Cemagref de Bordeaux/Cestas, UR Qualité des Eaux, 50 avenue de Verdun, 33630 Cestas

** Laboratoire LEESA, UMR CNRS EPOC 5805, Université Bordeaux 1, Place Peyneau, 33120 Arcachon

Deux études ont été menées au niveau de la partie médiane de la rivière Lot (Sud-Ouest de la France) et dans un de ses affluents, le Riou-Mort. Une ancienne usine d'extraction de zinc a provoqué la contamination par les métaux (Cd et Zn) du Riou-Mort et de la rivière Lot. Les communautés de diatomées ont été étudiées en automne, lorsque les diatomées dominent dans le périphyton, au niveau de trois sites situées le long du gradient de pollution polymétallique : un site de référence, un site faiblement pollué (50µgZn/L, 1µgCd/L) et un site pollué (500 µg Zn/L, 8 µg Cd/L). Au cours des deux études, des substrats artificiels (lames de verre) ont été utilisés pour permettre un échantillonnage homogène des communautés périphytiques sur les trois sites.

Lors de la première étude, menée en novembre-décembre 1998, la colonisation des substrats artificiels a été suivie pendant un mois. Les lames de verre ont été placées dans des canaux artificiels alimentés avec l'eau de la rivière, de manière à obtenir des débits identiques sur les trois sites. La translocation d'une partie des canaux depuis le site de référence vers les stations contaminées, après deux semaines de colonisation, a permis d'analyser les changements structuraux s'opérant au sein des communautés du site de référence, après exposition à la pollution métallique.

Lors de la deuxième étude, menée en octobre-novembre 1999, la colonisation des substrats artificiels a été suivie sur les trois sites pendant deux mois. Les lames de verre ont été placées directement dans la rivière, dans des cagettes en plastique munies de flotteurs. Une partie des cagettes a été transférée du site de référence vers les sites pollués, après un mois.

Au cours des deux études, la structure des communautés de diatomées a été étudiée en déterminant la densité des diatomées (nombre de cellules/cm²) et les abondances relatives des différentes espèces. Les résultats des deux études présentent des différences, inhérentes aux protocoles expérimentaux et aux variations des facteurs physico-chimiques, mais des tendances similaires se dégagent : la densité est significativement affectée sur le site pollué, alors que la richesse spécifique est comparable sur les trois stations. Une analyse en composantes principales (ACP) a permis de dégager les espèces caractéristiques du site de référence, du site faiblement pollué et du site pollué. Des frustules anormaux de diatomées ont été observés sur les stations polluées.

Ces deux études nous ont permis de réunir des informations sur les réponses des diatomées face à une pollution métallique relativement faible, mais la variabilité des facteurs physico-chimiques inhérente aux études de terrain ne permet pas de tirer de conclusion précise sur l'effet des métaux. Des expériences de laboratoire sont en cours de réalisation, dans le but de vérifier, en conditions contrôlées, les stratégies des différentes espèces.

Effects of metallic pollution (Cd, Zn) on the periphytic diatoms communities using outdoor experimental streams

C. Gold ^{*/**}, A. Feurtet-Mazel ^{**}, M. Coste ^{*} and A. Boudou ^{**}

^{*} Division Qualité de l'Eau, Cemagref, Cestas, France ^{**} LEESA ⁽¹⁾, Université Bordeaux 1 / CNRS, Arcachon, France

Introduction

Periphytic diatoms are dominant in the microbenthic algal communities developed on every aquatic substrata (rocks, sediment, plants,...). These organisms have shown to be sensitive to the degradation of habitats and water quality in excessive organic pressure conditions. To study the effects of metallic pollutions on these communities, and oppositely the ability of diatoms to reveal these contaminations, a study has been conducted in a metal polluted stream (Cd, Zn), the river Lot (SW of France), in autumn (november - december 1998).

Study area

The experiments were conducted in 3 sites, showing different pollution levels (Fig. 1, 2):
 - Reference site (R): in the river Lot, upstream of the junction with the Riou-Mort, a small tributary of the Lot extremely polluted by a former zinc factory,
 - Slightly polluted site (SP): in the Lot, downstream of the junction with the contaminated tributary,
 - Polluted site (P): in the Riou-Mort.

	Site R	Site SP	Site P
[Cd dissolved]	<LD	0.5 - 1.9 µg.l ⁻¹	4.9 - 8.3 µg.l ⁻¹
[Zn dissolved]	<LD	15 - 88 µg.l ⁻¹	230 - 675 µg.l ⁻¹
Temperature	3-8 °C	3-8 °C	18-15 °C
Conductivity	100-200 µS	100-200 µS	350-700 µS

Fig. 2 : Main physico-chemical factors

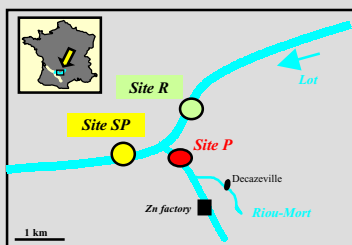


Fig. 1: Study area

Experimental setup

Glass slides (360 cm² surface) were used as an artificial substratum for algal attachment (Fig. 3). Substrata were placed vertically in artificial streams located on the bank and supplied with river water (Fig. 4 et 5).

Experiment 1: 2 artificial streams were placed for 4 weeks on each site (R, SP, P), to follow the colonization along the pollution gradient (Fig. 6).

Experiment 2: 4 artificial streams were placed for 2 weeks on the reference (R) site, and then 2 were translocated to the slightly polluted (SP) site and 2 to the polluted (P) site for 2 weeks (Fig. 7).

Every week, artificial substrata were removed and scraped to collect the benthic communities. Diatom density and species composition were determined after a chemical treatment (H₂O₂ and HCl), using photonic microscopy.

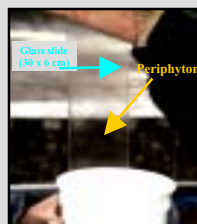


Fig. 3 : Artificial substratum

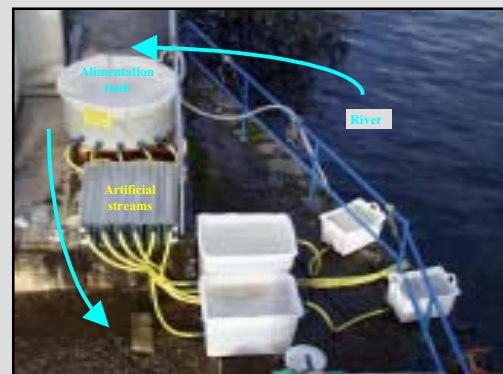


Fig. 5 : Experimental system



Fig. 4 : Artificial streams

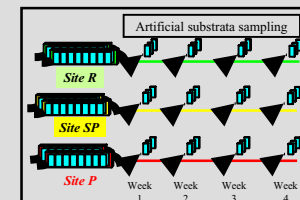


Fig. 6 : Experiment 1 colonization along the pollution gradient and samples

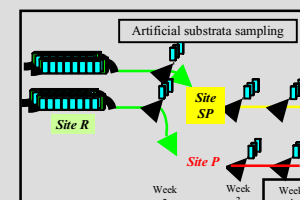


Fig. 7 : Experiment 2 translocation of artificial streams from reference (R) to polluted (SP, P) sites and samples

Results

In the reference (R) and the slightly polluted (SP) sites, diatoms show a very rapid exponential growth, reaching more than 100 000 diatoms/cm² after 4 weeks (Fig. 8). In the polluted (P) site, the growth seems to be inhibited after 2 weeks, with less than 50 000 diatoms/cm².

2 weeks after the translocation to the slightly polluted (SP) site, diatoms growth significantly slows down (Fig. 9), comparatively to the communities stayed in the reference site (Fig. 8). After translocation to the polluted (P) site, the growth is completely inhibited.

Diatom species composition is very similar on the R and SP sites (Fig. 10), with 2 extremely dominant species: *Melosira varians* (yellow bars) and *Nitzschia dissipata* (red bars). No alteration appears after translocation to the SP site. On the contrary, species composition of the P site is very homogeneous, dominances stumping with time after translocation.

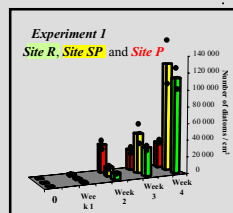


Fig. 8 : Diatom density

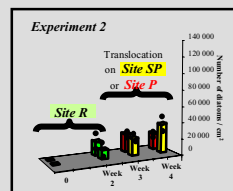


Fig. 9 : Diatom density

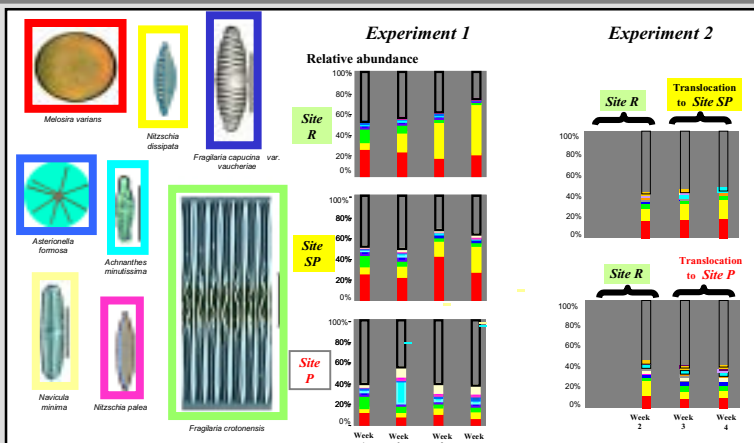


Fig. 10 : Diatoms species composition (relative abundances of the major taxa)

Conclusion

These results seem to show an impact of metallic pollution in diatoms communities in the polluted (P) site, quantitatively (density) and qualitatively (species composition). In the same time, the growth of reference communities is affected by slight contamination after translocation.

But other physical and chemical variables also participate in structuring microphytobenthic communities, as temperature. To complete these field experiments, laboratory studies are actually performed under controlled physico-chemical conditions, to precise the real effect of the 2 metals in this biotic compartment.

Use of indoor experimental stream to assess structural effects of cadmium (Cd) on periphytic diatom communities

C. Gold ***, A. Feurtet-Mazel **, M. Coste * and A. Boudou **

Division Qualité de l'Eau, Cemagref, Cestas, France ** LEESA ⁽¹⁾, Université Bordeaux 1 / CNRS, Arcachon, France *

Introduction

Periphytic diatom communities (microbenthic algal assemblages) are very important primary producers of streams.

A field study was conducted in autumn along a polymetallic pollution gradient (River Lot subsystem, SW of France), to determine impact of metals (Cd/Zn) on these microbenthic communities. Structural perturbations were observed in the most polluted site (<10 µg Cd.L⁻¹, <700 µg Zn.L⁻¹), after 4 weeks of artificial substrates colonization: global diatom community growth was strongly reduced, and community evolution was affected, with inhibition of biofilm top layer development.

A laboratory experiment was performed to complement this field experiment, by studying impacts of Cd on River Lot diatom communities under controlled conditions, in indoor experimental streams.

Results

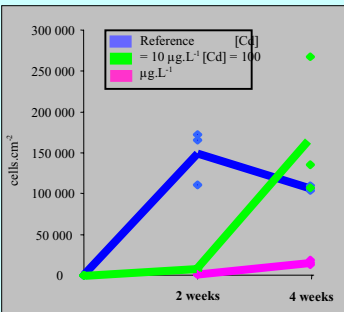


Fig. 4: Total density of diatoms

In the reference streams, maximal densities were reached after 2 weeks, and diatom growth stopped afterwards.

In the streams contaminated by 10 µg Cd.L⁻¹, global diatom growth was delayed, while it was clearly inhibited at 100 µg Cd.L⁻¹.

Material and Methods



Fig. 1



Fig. 2

River periphyton collection

Autumnal samples were collected in the River Lot, above metallic pollution discharge (reference site, Fig. 1).

Cages equipped with floats and containing glass substrates for algal attachment (Fig. 2) were immersed during 1 month in the river.



Fig. 3

Laboratory experimental system

Periphyton collected in the river was equally inseeded in three closed experimental systems, to study development under three different Cd levels: 0, 10 and 100 µg Cd.L⁻¹.

Water Cd was measured every day in the contaminated systems (absorption spectrophotometry), and adjusted Cd additions were realized to guarantee constant mean contamination.

Glass substrates were collected after 2 and 4 weeks, to study the diatom communities developed on their surface.

Controlled parameters were fixed

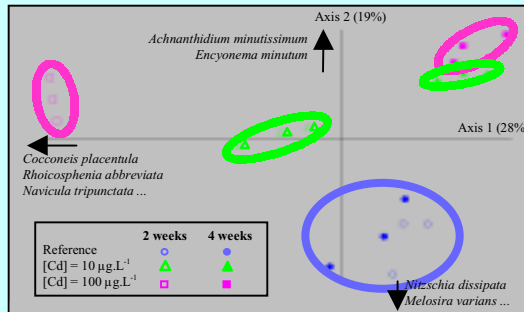


Fig. 5: Principal component analysis (PCA) based on the relative abundances of the 55 dominant species within diatom communities

Diatom communities of the reference streams were clearly separated from those of the contaminated streams (Fig. 5), with higher relative abundances of *Melosira varians* and *Nitzschia dissipata* (Fig. 6).

Contaminated communities were mainly characterized by higher abundances of *Cocconeis placentula*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Navicula tripunctata* after 2 weeks of colonization, particularly at 100 µg Cd.L⁻¹, and by higher abundances of *Achnanthydium minutissimum* and *Encyonema minutum* after 4 weeks (Fig. 5 and 6).

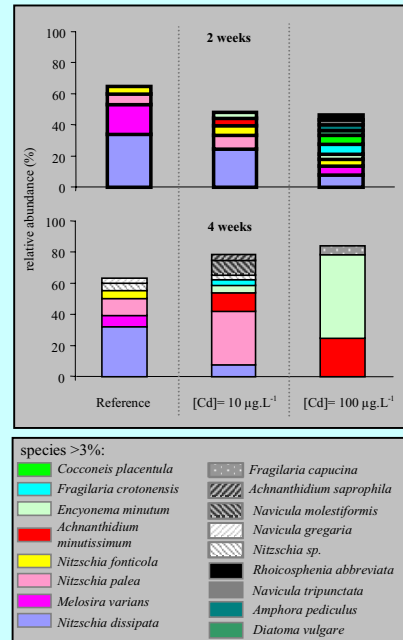


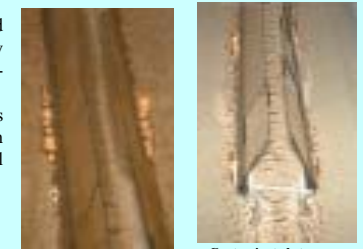
Fig. 6: Taxonomic composition of communities

Conclusion

This study revealed strong structural perturbations induced by Cd within periphytic diatom communities, both on their global growth and taxonomic composition. It also gave information about Cd tolerance range of diatom species: *Melosira varians* and *Nitzschia dissipata* seemed to be sensitive, whereas *Achnanthydium minutissimum* and *Encyonema minutum* appeared to be tolerant.

These results obtained under controlled conditions are in agreement with those of the field experiment conducted previously, and suggest that metal pollution had an effect on biofilm architecture:

reference substrates were covered by a thick dark brown layer, mainly constituted of filaments of the top-layer species *Melosira varians*, whereas contaminated biofilms stayed thinner and adpressed on substrates, constituted of small adnate species.



Reference streams

Contaminated streams

RESUME

Une démarche méthodologique en plusieurs étapes a été développée afin d'évaluer les effets de la pollution métallique sur la structure des communautés de diatomées périphytiques, associant des études multispécifiques réalisées dans les conditions complexes du milieu naturel, puis dans les conditions simplifiées du laboratoire. Les études de terrain ont été menées au niveau du gradient de pollution polymétallique (Cd/Zn) de la rivière Lot (SO, France). Les résultats des différentes approches expérimentales ont globalement présenté une très grande complémentarité. Une réduction marquée de l'architecture en trois dimensions des biofilms périphytiques a été mise en évidence dans le cas d'une exposition à la pollution intervenant dès la phase initiale du développement des communautés. L'étude parallèle de communautés exposées aux métaux à un stade avancé de développement (maturité) a permis de mettre en évidence le rôle protecteur exercé par la matrice organique des biofilms périphytiques vis-à-vis de la pollution métallique. Les résultats ont également apporté des informations sur le comportement de plusieurs espèces de diatomées face aux métaux, certains taxons - comme *Melosira varians* ou *Nitzschia dissipata* - semblant présenter une grande sensibilité, alors que d'autres - comme *Achnantheidium minutissimum*, *Encyonema minutum*, *Cyclostephanos dubius*, *Nitzschia palea*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Cocconeis placentula* ou *Fragilaria crotonensis* -, ont présenté une grande tolérance à la pollution par le cadmium, pour les niveaux expérimentaux testés. Une étude complémentaire monospécifique, menée au niveau d'une population d'*Achnantheidium minutissimum* cultivée en milieu contrôlé, a permis de préciser le comportement de cette espèce par rapport à la contamination par le cadmium. L'ensemble de ces études révèle les potentialités des communautés de diatomées périphytiques en tant qu'indicateurs biologiques de la pollution métallique.

MOTS-CLES

Ecotoxicologie aquatique - Périphyton - Biofilms - Diatomées - Métaux - Cadmium - Zinc - Canaux artificiels.

ABSTRACT

A progressive methodology was developed to assess the effects of metallic pollution on the structure of periphytic diatom communities, including multispecific studies at the community-level, performed under complex conditions in the field and then under simplified conditions in the laboratory, and monospecific studies at the population-level, on diatom cultures. Field studies were conducted along the polymetallic (Cd/Zn) pollution gradient of the River Lot (SO, France). Results of the different approaches globally showed a great complementarity. A marked reduction of periphytic biofilms tri-dimensional architecture was demonstrated when metal exposure occurred since first development stages. Parallel study of communities submitted to metals at a later development stage (maturity) revealed the protective role exerted by the organic matrix of periphytic biofilms against metal stress. Results also brought informations on the behaviour of several diatom species, some taxa - like *Melosira varians* or *Nitzschia dissipata* - having presented a high sensitivity, whereas others - like *Achnantheidium minutissimum*, *Encyonema minutum*, *Cyclostephanos dubius*, *Nitzschia palea*, *Rhoicosphenia abbreviata*, *Cocconeis placentula* or *Fragilaria crotonensis* -, having shown a good metal tolerance. Periphytic diatom communities could therefore represent potential biological indicators of metallic pollution.

KEYWORDS

Freshwater ecotoxicology - Periphyton - Biofilms - Diatoms - Metals - Cadmium - Zinc - Artificial streams.